



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STRUKTURNÍ ASPEKTY INTERAKCE HUMINOVÝCH LÁTEK S IONTOVÝMI ORGANICKÝMI XENOBIOTIKY

STRUCTURAL ASPECTS OF INTERACTION BETWEEN HUMIC SUBSTANCES AND CHARGED ORGANIC XENOBIOTICS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Adam Prisažný

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1517/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Adam Prisažný**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Strukturní aspekty interakce huminových látek s iontovými organickými xenobiotiky

Zadání diplomové práce:

- 1) Zpracovat aktuální literární rešerši na téma interakce huminových látek (HL) s organickými ionty (metody studia, environmentální konsekvence).
- 2) Na základě literární rešerše zvolit vhodný modelový systém (HL + organický iont/y) a metodiku studia interakcí, které mezi oběma složkami systému probíhají.
- 3) Na modelovém systému realizovat sérii experimentů za účelem komplexní strukturní charakterizace interakcí. HL – organický iont
- 4) Na základě realizovaných experimentů zhodnotit výhody a limitace použité metodiky, diskutovat nové poznatky o strukturních aspektech interakcí mezi HL a organickými ionty.

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Adam Prisažný
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto diplomová práca bola zameraná na štúdium interakcie humínových látok s iónovými organickými xenobiotikmi a jej štruktúrne aspekty. Metóda bola zvolená z mojej bakalárskej práce, a to ustálená fluorescenčná spektroskopia, ktorá je vhodná i pre látky so slabou fluorescenciou. Výsledky ukázali, že interakcia medzi humínovými kyselinami a zástupcom iónových organických xenobiotik (Septonex) sa prejavila zhášaním fluorescencie humínových kyselín a posunom emisného maxima k nižším vlnovým dĺžkam, hypsochromným (modrým) posunom. Z výsledkov meraní môžeme predpokladať, že interakcia, ktorá sa vytvára medzi aromatickými štruktúrami v humínových kyselinách a Septonexom, môže byť π -katión interakcia.

ABSTRACT

This diploma thesis was focused on studying the interaction of humic substances with ionic organic xenobiotics and its structural aspects. The method was chosen from my bachelor thesis, steady-state fluorescence spectroscopy, which is suitable for substances with weak fluorescence. The results showed that the interaction between humic acids and representatives of ionic organic xenobiotics (Septonex) was reflected in fluorescence quenching of humic acids and the shift of emission maximum to lower wavelength, hypsochromic (blue) shift. From the measurement results, we can assume that the interaction that is formed between the aromatic structures in humic acids and Septonex could be π -cation interaction.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Humínové kyseliny, metylovaná modifikácia, zhášanie fluorescencie, modrý posun, excitačno-emisné spektrá, xenobiotikum, Septonex

KEY WORDS

Humic acid, methylate modification, fluorescence quenching, blue shift, excitation-emisional spectrums, xenobiotic, Septonex

PRISAŽNÝ, Adam. *Strukturní aspekty interakce huminových látek s iontovými organickými xenobiotiky* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-10]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131165>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho práce a dekana FCH VUT.

.....

Podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som rád poďakoval vedúcemu mojej diplomovej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. za vynikajúci prístup, vedenie a cenné rady poskytnuté pri riešení tejto diplomovej práce. Ďalej by som chcel poďakovať Ing. Jitke Krouské Ph.D a Ing. Vojtěchovi Enevovi, Ph.D. za pomoc v experimentálnej časti tejto práce. Špeciálne poďakovanie patrí mojej rodine, mojej priateľke a kamarátom za neustálou podporu počas celého môjho štúdia.

Obsah

1	Úvod	7
2	Cieľ Práce	8
3	Teoretická časť	9
3.1	Humus a humínová hmota	9
3.1.1	Rozdelenie humínových látok	9
3.2	Humínové kyseliny	10
3.2.1	Štruktúra humínových kyselín	12
3.2.2	Možnosti modifikácie štruktúry HL	14
3.2.3	Aplikácia humínových kyselín	14
3.3	Fluorescencia a jej využitie pre štúdium štruktúry HL	15
3.3.1	Zhášanie fluorescence	17
3.3.2	Fluorescenčná spektroskopia	18
3.3.3	Excitačno-emisné spektrá	18
3.3.4	Vnútorý filtračný efekt	19
4	Súčasný stav riešenej problematiky	21
4.1	Metódy vhodné na štúdium medzimolekulových interakcií medzi organickými látkami	21
4.2	Interakcie humínových látok s rôznymi látkami	23
4.2.1	Interakcie humínových látok s organickými látkami	24
5	Experimentálna časť	26
5.1	Použité chemikálie	26
5.2	Použité prístroje a pomôcky	26
5.3	Software pre zpracovanie a interpretáciu dát	26
5.4	Selektívna metylácia humínových kyselín	27
5.5	Laboratórny postup	27
5.5.1	Ustálená fluorescenčná spektroskopia	27
5.5.2	Stanovenie celkovej, karboxylatovej a fenolickej kyslosti	29
6	Výsledky a diskusia	31
6.1	Porovnanie humínových kyselín s ich metylovanou modifikáciou	31
6.2	Štruktúrne aspekty interakcie humínových kyselín so xenobiotikom	32

7	Záver.....	44
8	Zdroje.....	45
9	Zoznam použitých skratiek a symbolov.....	49
10	Prílohy.....	50

1 ÚVOD

Humínové látky (HL) sú široko sa vyskytujúce látky na povrchu Zeme, ako hlavné zložky pôd a sedimentov sa nachádzajú v takmer všetkých suchozemských a vodných prostrediach. Vznikajú pri biologickej i chemickej degradácii rastlinných a živočíšnych zvyškov, ale aj ako výsledok syntetických aktivít mikroorganizmov. Produkty týchto reakcií sú spájané do zložitejších chemických štruktúr, ktoré sú stabilnejšie ako východiskové materiály.

Humínové látky sú predmetom rôznych štúdií a výskumov, s využitím v rôznych odvetviach priemyslu. Jedná sa o látky s jedinečnou chemickou štruktúrou a prirodzeným výskytom v pôde i v iných prírodných zdrojoch. Vďaka veľkému množstvu rôznorodých funkčných skupín vo svojej štruktúre sú humínové látky schopné interagovať s mnohými druhmi látok z radu anorganickej alebo organickej chémie. Pre ich všestranné využitie je potreba dôkladne porozumieť mechanizmu interakcií humínových látok s konkrétnymi druhmi látok. Mnoho autorov prispelo svojimi prácami na tému interakcií humínových látok so širokou škálou látok (napr. farbivá, tenzidy, biocidy, farmaceuticky zaujímavé látky, a pod.) do celkového stavu poznania. To svedčí, že každá vedecká spoločnosť má záujem o humínové látky a ich využitie vo svojich odvetviach.

Táto diplomová práca bola zameraná na štúdium interakcie humínových skupín s iónovými organickými xenobiotikmi a jej štruktúrne aspekty. Metóda bola zvolená z mojej bakalárskej práce, a to ustálená fluorescenčná spektroskopia, ktorá je vhodná i pre látky so slabou svietivosťou. Cieľom práce bolo na základe realizovaných experimentov sa zhodnotiť výhody a limity použitej metodiky, diskutovať nové poznatky o štruktúrnych aspektoch interakcií medzi HL a organickými iónmi.

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto práce je spracovať aktuálnu literárnu rešerš na tému interakcie humínových látok (HL) s organickými iónmi, ako metódy štúdií, environmentálne konsekvencie a pod. Následne po spracovaní literárnej rešerše sa zvolí vhodný modelový systém (HL + organický ión/i) a metodiku štúdií interakcií, ktoré medzi obidvoma zložkami systému prebiehajú. Na modelovom systéme sa bude realizovať série experimentov za účelom komplexnej štruktúrnej charakterizácie interakcií HL - organický ión/i. Na základe realizovaných experimentov sa zhodnotia výhody a limity použitej metodiky a budú sa diskutovať nové poznatky o štruktúrnych aspektoch interakcií medzi HL a organickými iónmi.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Humus a humínová hmota

„Humus“ ako pojem bol používaný už v staroveku, ktorým označovali pôdu ako celok. Až neskôr bol priradený tento pojem k organickej hmote v pôde. Jednu z teórie súčasného vnímania konceptu humusu stanovil Waksman, ktorý definoval humus ako komplexný agregát amorfných látok zafarbených do hnedej až tmavej farby, ktoré vnikajú mikrobiálnym rozkladom rastlinných a živočíšnych pozostatkov v pôdach, kompostoch a vodných nádržiach [1].

Humus je rozdeľovaný na nehumínovú a humínovú zložku. Do nehumínovej zložky zaraďujeme látky produkované rastlinami a ďalšími organizmami alebo i látky vzniknuté čiastočným rozkladom rastlinných a živočíšnych pozostatkov. Tieto látky predstavujú vstupný materiál, z ktorého ďalšou degradáciou vzniká humínová zložka humusu, ktorá sa označuje pojmom humínová hmota. Humínová hmota je najviac rozšíreným materiálom na svete obsahujúci uhlík. Vyskytuje v pôdach, v tečúcich i stojatých vodách, v sedimentoch, od tropických oblastí až po arktické krajiny. Humínovu hmotu rozdeľujeme na vodné, mokradné, pôdne, geologické a antropogenné. Zložkami humínovej hmoty sú rôzne humínové látky [2].

3.1.1 Rozdelenie humínových látok

Najčastejšie a najtradičnejšie rozdelenie humínových látok je podľa rozpustnosti. V súčasnosti rozlišujeme tri hlavné frakcie humínových látok: fulvínové kyseliny, humínové kyseliny a humíny [2], [3].

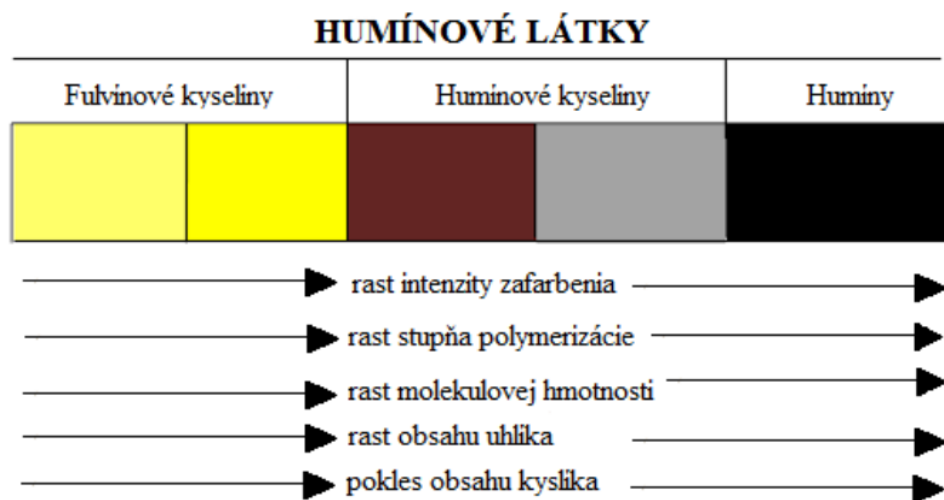
Fulvínové kyseliny (FK) sú látky s najnižšou molekulovou hmotnosťou zo všetkých frakcií (2 000 až 8 000 g·mol⁻¹). Sú zafarbené žlté až hnedočierne. Aromaticita fulvínových kyselín je nižšia, ale vykazujú sa vysokým obsahom kyslíkatých organických zložiek, ako napríklad karboxylové skupiny. FK sú rozpustné v alkalickom i kyslom prostredí pri všetkých pH hodnotách [3], [4].

Humínové kyseliny (HK) sú frakcia s vysokou molekulovou hmotnosťou (10 000 až 200 000 g·mol⁻¹). Sú nerozpustné vo vode, ale rozpustné v alkalickom prostredí. Okyslením roztoku dôjde k ich precipitácii. Sú zafarbené tmavohnedo. Do frakcie humínových kyselín radíme i humáty, čo sú soli humínových kyselín rozpustné vo vode vo všetkých hodnotách pH [3], [4].

Humíny (HU) sú zo spomínaných frakcií látky s najväčšou molekulovou hmotnosťou. Sú to nerozpustné látky a majú najmenšiu reaktivitu o všetkých frakcií. Sú zafarbené do čierne [2], [3].

Podľa niektorých teórií je tmavé zafarbenie humínových látok spojené s prítomnosťou zložiek s vysokou molekulovou hmotnosťou. Obr. 1 poukazuje na fakt, že s rastúcou molekulovou hmotnosťou dochádza k zmenám obsahu uhlíku a kyslíku, kyslosti a stupňa polymerácie. Rozdiel medzi frakciami humínových látok môže byť práve vysvetlený rozdielnymi hodnotami spomínaných parametrov. Humínové kyseliny sú látky s nižším obsahom kyslíka, ale s vyšším obsahom kyslíka na rozdiel od nízkomolekulárnych fulvínových

kyselín. Fulvínové kyseliny obsahujú vyšší počet funkčných skupín kyslého charakteru, preto ich celková kyslosť je vyššia od humínových kyselín a podstatne vyššia od humínov.



Obr. 1: Rozdelenie HL a ich vlastnosti [5]

V kontexte metód charakterizácie humínových látok v tejto diplomovej práci je zaujímavé rozdelenie podľa štúdie Senesi a spol. [6], ktorí rozdelili tieto látky podľa ich fluorescenčného chovania odvíjajúceho sa od pôvodu a povahy materiálu. Rozdelili ich do piatich tried. Do prvej triedy zaradili praveké soli humínových kyselín, ktoré sú charakteristické pre ich vysoké fluorescenčné dĺžky v emisnom (> 520 nm) i v excitačnom maxime (> 465 nm). Zo všetkých tried majú najnižšiu súhrnnú relatívnu fluorescenčnú intenzitu. Do druhej triedy zaradíme najviac humínových solí (Leonardite, Mollisol, apod.). Ich emisné maximum je podobné prvej triede (520–500 nm), hlavnou charakteristikou sú dva hlavné excitačné píky, ktoré sú od seba oddelené a uzavreté (450 a 465 nm). Súhrnná intenzita relatívna fluorescenčná intenzita (R.F.I) je pomerne nízka (2–8). Do 3. triedy zaradíme niektoré soli *terra rosa* (červenkastá pôda v pásme Stredozemného mora) alebo z naplavenín ílu. Emisné maximum pre nich charakteristické je s nižšou vlnovou dĺžkou (500–460 nm) a hlavný excitačný pík je v rozsahu 450–440 nm. R.F.I je najvyššie zo všetkých tried (6–29). Do štvrtej triedy patria soli z húb a kompostov a soli fulvínových kyselín získané z rašielin. Emisné maxima sú najčastejšie v nižších vlnových dĺžkach (470–440 nm) a vrchol excitácie majú v rozsahu 395–385 nm. R.F.I je rôzne, soli fulvínových kyselín ho majú vyšší (> 10) ako soli humínových kyselín (1–7). Do poslednej piatej triedy zaradíme fulvínové a humínové kyseliny z odpadných vôd alebo kalov. Zo všetkých tried majú najnižšie vlnové dĺžky pre emisné maximum (< 440 nm). Hlavný excitačný pík sa nachádza v takmer rovnakých vlnových dĺžkach ako vo štvrtej triede (okolo 390 nm). Typické pre túto triedu ale vedľajší excitačný pík okolo 340 nm. R.F.I majú v rozmedzí 4–13.

3.2 Humínové kyseliny

Humínové kyseliny sú hlavnou a stabilnou zložkou organickej hmoty vyskytujúcej sa v pôdach alebo vodách. HK sú zložené polydisperzné zmesi heterogénnych polyelektrolytov

skúmané celou radou analytických metód. Ich štruktúru je ťažko zjednotiť, každá molekula HK je natoľko unikátna a nejednotná, že mnohí autori sa zhodli na tom že neexistujú dve molekuly HK ktoré by boli vzájomne totožné. Ak existujú, je ich veľmi málo [7].

Pri rôznorodosti štruktúr humínových kyselín sú ich základné vlastnosti silne závislé na ich pôvode, ale i na procese izolácie. Vlastnosti HK sa môžu ovplyvniť i počas extrakcie z vstupného materiálu použitím rôznych extrakčných činidiel [8]. Humínové kyseliny v kyslom prostredí koagulujú a na rozdiel od fulvínových kyselín vykazujú vyšší stupeň kondenzácie a polymerácie. HK sú materiály bohaté na uhlík, majú konštantný obsah karboxylových kyselín ($3 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$), ale rôzny obsah fenolových skupín, tým pádom i rôznu kyslosť. I keď štruktúra každej molekuly HK je unikátna, pozoruhodné je to že všetky „molekuly“ HK majú podobný empirický vzorec [9].

Humínové kyseliny menia svoju štruktúru v závislosti na čase alebo na podmienkach ktorým sú vystavené. Novák a spol. zistili svojou štúdiou, že humínové kyseliny extrahované z polí, ktoré boli po intenzívnej poľnohospodárskej činnosti, obsahuje viac funkčných skupín od humínových kyselín, ktoré pochádzajú z uhlia [10]. Dôvodom môže byť efektívnejšia oxidácia, ktorá nastala dôsledkom poľnohospodárskej činnosti. Ďalšie štúdie sa zamerali na vplyv organických látok, ktoré sú pridávané do pôdy, na zloženie humínových kyselín. Skúmalo sa zastúpenie základných biogénnych prvkov v humínových kyselinách extrahovaných z pôdy, surového kompostu a z pôdy po 9 mesiacoch od pridania kompostu. Zaujímavý výsledok sa naskytol pri skúmaní HK z odloženej pôdy s kompostom, kde sa namerá nižší obsah uhlíka ako v pôde bez kompostu. To môže naznačovať, že HK z kompostu interagovali s pôdnymi HK a prispievali k hromadeniu organického uhlíku v pôde [11]. Vplyv na štruktúru humínových kyselín má i pridávanie organického materiálu do pôdy. Interakcia sa prejavila poklesom molekulovej hmotnosti HK, ich aromaticity a stupňa kondenzácie. Molekuly HK s pridaným organickým materiálom mali tendenciu sa správať viac alifaticky a štruktúrne sa zjednodušovali. Naopak HK z pôdy, kde nebol organický materiál pridaný, mal trend opačný [12].

Humínové kyseliny obsahujú trojrozmerné zosieťované molekuly, v ich strede je aromatické jadro obsahujúce dusíkaté a kyslíkaté heterocykly. Na toto jadro sa naväzujú alifatické reťazce s bohatým obsahom rôznych aktívnych funkčných skupín. Medzi aktívne funkčné skupiny na molekulách HK zaradíme predovšetkým karboxylové, hydroxylové a fenolické skupiny. Humínové kyseliny sa chovajú ako slabé elektrolyty, je to dôsledkom prítomnosti karboxylových, fenolových skupín, a ďalších iných častí molekuly HK. Tieto spomenuté skupiny môžu byť disociované, kedy sa vyvinie záporný náboj, naopak primárne a sekundárne amínové a imidové skupiny môžu byť protónované, čiže vznikne kladný náboj [13].

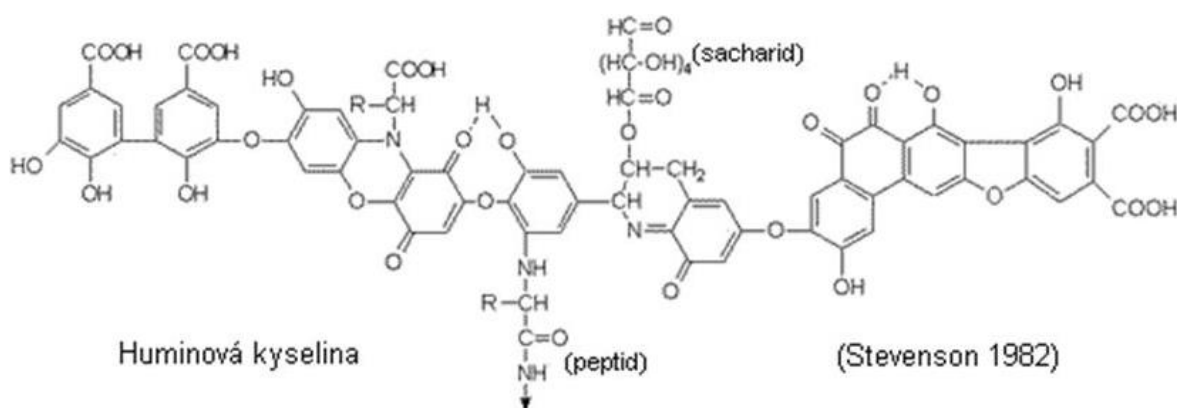
Humínové kyseliny obsahujú vo svojej štruktúre hydrofilné i hydrofóbne oblasti, čo je dôvodom prečo môžu byť adsorbované na povrchoch mnohých častíc. Z ich štruktúry vyplýva povrchová aktivita, agregáčne schopnosti, konformačné zmeny, disperzibilita, sorpčné, iónovovýmenné a chelátotvorné vlastnosti. Vďaka týmto vlastnostiam sú schopné reagovať s veľkou škálou látok, od ťažkých kovov až po organické a anorganické polutanty. Ale jedna z najdôležitejších vlastností humínových kyselín je ich veľká pufrčná schopnosť v širokom

rozpätí pH. Príčinou tejto vlastnosti je schopnosť disociácie acidických skupín, ktorých humínové kyseliny majú vo svojej štruktúre veľké množstvo. Avšak presný príspevok tejto tlmiacej schopnosti nie je upresnený a známy [11], [14].

3.2.1 Štruktúra humínových kyselín

Humínové kyseliny sú predmetom rôznych výzkumov a štúdií cez 100 rokov, i tak ich štruktúra nie je doteraz objasnená. Pre pochopenie ich chemických interakcií s ostatnými látkami je zásadne vedieť ich štruktúrne zloženie.

Prvé návrhy štruktúry humínových kyselín boli na svet ukázané F. J. Stevensonom (1972) a R. D. Harworthem (1973). Vznikali hypotetézy, že štruktúra humínových látok, podobne ako štruktúra hnedého uhlia, bude tvorená kostrou so zabudovanými polyaromatickými uhl'ovodíkmi. Štruktúra navrhnutá Stevensonom (*Obr. 2*) obsahuje fenolické skupiny, voľné i viazané, ďalej chinónové štruktúry, dusíkaté a kyslíkové atómy vo funkcii mostíkov a karboxylové skupiny umiestnené na aromatických kruhoch. Obsah hydroxylových skupín je závislý na pôvode pôdy a použitom spôsobe spracovania humínových látok [15].



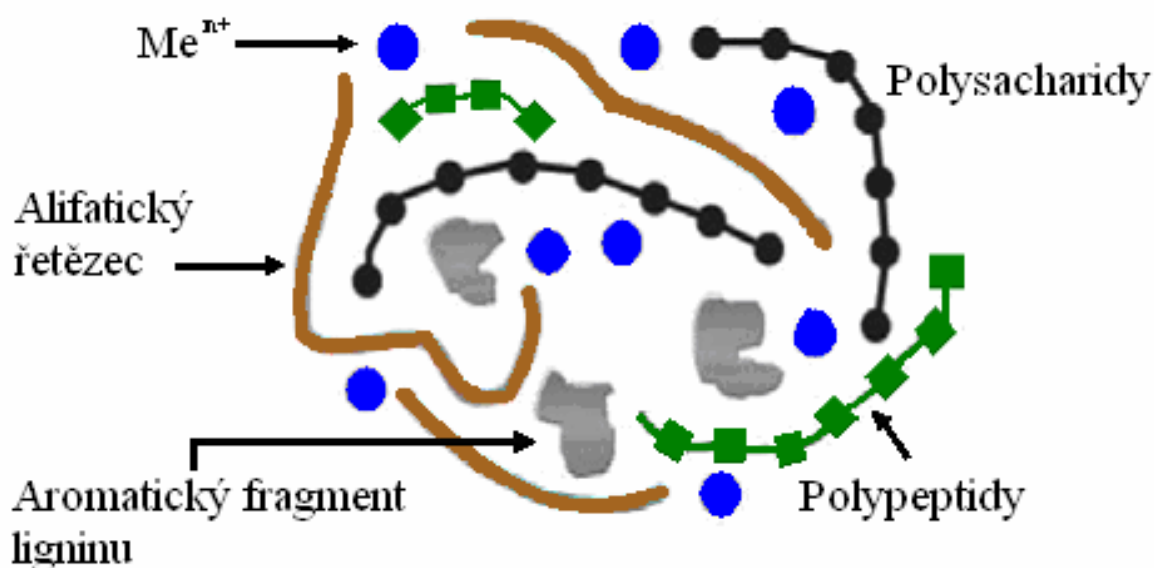
Obr. 2: Návrh štruktúry humínových látok podľa Stevensona [16]

V dnešnej dobe pri pokroku v inštrumentálnej a štruktúrnej analýze je tento pohľad už nedostačujúci. Ukázalo sa, že skutočná štruktúra humínových kyselín je oveľa viav zložitejšia. Na humínové látky sa po dlhej dobe pozeralo ako na polymerné zlúčeniny s lineárnou štruktúrou, ktoré su obsadené v pôdach. V prípade fulvínových kyselín sa malo jednať o látky s molekulovou hmotnosťou do 50 000 Da, pre humínové kyseliny sa hodnota hýbala nad 300 000. Taktiež boli považované z tradičného hľadiska ako produkty biosyntézy špecifických látok, ktoré mali pôvod z látok ako lignin, celulóza, aminokyseliny a podobne. Tento pohľad o ich štruktúre bol avšak vyvodený na základe laboratórnych experimentov s vymodelovanými molekulami alebo zo štúdií, ktoré sa venovali vznikom týchto veľkých celkov z jednoduchších štruktúr za daných reakčných podmienok. Táto koncepcia nebola podložená žiadnym priamym dôkazom, ktorý by dokazoval, že v pôde za reálnych podmienok takéto reakcie skutočne prebiehajú [17].

Humínové kyseliny sú makromolekuly, ktoré vo svojich štruktúrach majú zabudované aromatické a alicyklické kyseliny. Medzi aromatickými skupinami spojenie zaisťujú alifatické uhl'ovodíky, aminokyseliny a peptidy. Pomocou modernejších fyzikálno chemických metód, ako napríklad hmotnostná spektroskopia, gélova chromatografia alebo NMR, sa zistilo, že priemerná hmotnosť jednotlivých molekúl humínových kyselín je o niečo len väčšia ako 1000 Da. Priemerná molekulová hmotnosť humínových látok je o to menšia, o čo je menší pomer hydrofilnej a hydrofóbnej časti v molekule. Štruktúrny model je tak založený na konceptu micely, čiže humínové kyseliny sú štruktúrou ako micely s hydrofóbnymi jadrami a nabitými polárnymi koncami [18].

Existuje však mnoho indícií, ktoré podporujú u humínových kyselín konformačne omnoho zložitejšiu štruktúru. Hypotézou je „supramolekulárny“ štruktúrny model, čiže humínové látky vytvárajú zoskupenia malých molekúl, ktoré vznikajú dôsledkom rozkladu organickej hmoty. Tieto malé zoskupenia sa náhodne zhlukujú do väčších heterogénnych celkov a potom vytvoria tzv. „supramolekulu“. V rámci nejakej podoby s teóriou micel, sa tento systém nechová ako obvyklá micela, pretože má iné konformačné chovanie. Pre tento štruktúrny model je hlavným argumentom prítomnosť slabých väzbových inetrakcií, ktoré môžu byť reverzibilne narušené. Slabé väzbové interakcie stabilizuje celý systém a zároveň môžu za zdajúcu veľkú molekulovú hmotnosť humínových látok [17].

Pomocou NMR bol vytvorený ďalší pohľad na štruktúru humínových látok. Ten predpokladá existenciu makromolekulárnych agregátov, ktoré sú zložené z veľkého množstva nízkomolekulárnych (< 2 kDa) organických komponentov ako napríklad alifatické kyseliny, estery, étery, alkoholy, aromatické fragmenty ligninu, polypeptidy a polysacharidy. Sú k sebe navzájom spútané celou radou slabých väzbových interakcií a väzbových mostíkov cez ióny kovov. Na Obr. 3 je znázornená navrhnutá schéma supramolekulárnej štruktúry podľa Simpsona [19].



Obr. 3: Štruktúra humínových kyselín navrhnutá Simpsonom [19]

Podľa novších poznatkov je supramolekula tvorená aromatickými zlúčeninami, ktoré vytvárajú niekoľko hydrofóbných agregátov s nízkou vnútornou mobilitou s menšími molekulami, ktoré sa zhlukujú do veľkého množstva mobilných molekulárnych zoskupení hydrofilného charakteru [19]. Detailnejšie preskúmanie tohto štruktúrneho modelu by mohli byť nápomocné pri získavaní ďalších znalostí o humínových kyselinách, humínových látkach humusu všeobecne. Objasnilo by to celkové väčšie pochopenie cyklu týchto látok v pôde a v prostredí. Ich tvar makromolekúl hrá veľkú rolu na ich sorpčné a komplexotvorné vlastnosti. Zoskupenie makromolekúl je silno ovplyvnená pH prostredím a iónovou silou. Pri nízkom pH má makromolekula pevnú globulárnu štruktúru, pri zvyšovaní pH sa štruktúra zoohýba a linearizuje. Pri nízkej koncentrácii solí sa môže vytvoriť neusporiadaná sieť. Zmena konformácie vplyvom pH je i následne zodpovedná za nerozpustnosť humínových kyselín v kyslom prostredí [21].

3.2.2 Možnosti modifikácie štruktúry HL

Štruktúra HL je veľmi komplexná a obsahuje veľké množstvo rôznych typov funkčných skupín. Pre štúdie štruktúry sú preto vhodnejšie stabilné deriváty HL, pre ich jednoduchšie štúdium [16]. Deriváty majú selektívne blokované konkrétne funkčné skupiny, čo sa využíva pri štúdiu kyslosti HL alebo vplyvu funkčných skupín na reaktivitu HL v rôznych procesoch [22].

Významnou technikou pre vznik štruktúrnej modifikácie HL je esterifikácia karboxylových skupín pomocou metanolu a tionyl chloridu. Ďalšou technikou je acetylácia fenolových a alkoholových hydroxylov použitím anhydridu kyseliny octovej a kyseliny sírovej. Andelković a spol. vo svojej štúdiu [23] použili esterifikáciu karboxylových skupín, ktoré boli premenené na metylestery. Týmto sa prejavila vysoká selektivita, špecifickosť a účinnosť techniky, na rozdiel od acetylácie, kde nastala blokácia aj iných funkčných skupín, okrem hydroxylových.

Naša fakulta prispela svojim dielom k štúdiu derivátov HL. Klučáková a spol. použili (Diazometyl)trimetylsilán (TMS-DM), ktorý je komerčne dostupný a používa sa k účelu metylácie karboxylových skupín a fenolov, k metylácii HK. Skúmali vplyv metylovanej modifikácie na difúziu. Metylované HK vykazovali pokles rýchlosti difúzie med'natých iónov v ich vytvorených precipitáciách, čo bolo spôsobené nižším obsahom karboxylových skupín oproti nemoifikovaným HK [24], [25].

3.2.3 Aplikácia humínových kyselín

Dôkazom aké výnimočné látky sú humínové látky je šírka ich použitia, ktorá zahŕňa na prvý pohľad nespojitelné oblasti poľnohospodárstva a biomedicíny. Balneoterapia je jedna z medicínskych aplikácií HL, zahŕňa využitie rašeliny k uzdravujúcim účelom. Ďalej HL vykazujú antivírusovú aktivitu, znemožňuje vytvárať väzbu vírusov na povrch bunky, má pozitívny vplyv na hemokoaguláciu a fibrinolýzu a majú protizápalové účinky [26]. V oblasti zápalových ochorení sú HL a produkty dlhodobo študované. Protizápalové účinky HL sa stávajú bezpečnou alternatívou v liečbe a prevencii zápalových nemocí, kde by nahradili rizikové nesteroidné protizápalové liečivá [27].

V oblasti poľnohospodárstva sa prvotne používali humínové kyseliny ako hnojivo. Je pre ne typické, že i ich veľmi nízka koncentrácia v pôde má pozitívny vplyv na rastlinu. Následné zvýšenie koncentrácie HK prinesie zvýšenie tohoto efektu len vtedy, ak sa súčasne zvýši i úroveň ďalších vonkajších faktorov, ako napríklad minerálnych živín alebo slnečného svetla. Humínové kyseliny sú v bežných pôdných podmienkach pevne viazané na minerálny podiel pôdy a sú vo vode nerozpustné. Z pohľadu poľnohospodárskej produkcie sú preto prakticky významné len vodorozpustné soli humínových kyselín, predovšetkým humáty vápenaté [28].

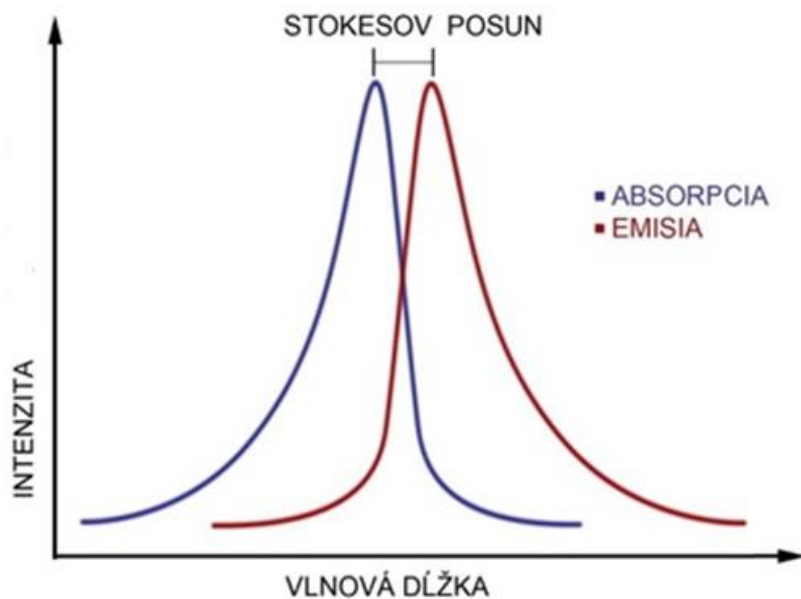
Humínové kyseliny reagujú na oxidačno-redukčné podmienky prostredia, v ktorom sa rastliny rozvíjajú. Bolo zistené, že pri nedostatku kyslíka HK uľahčujú rastlinám dýchanie a zvyšujú intenzitu koreňového dýchania [29].

V pôde sú súčasťou uhlíkového cyklu, zdrojom uhlíka, ale i ďalších živín pre rastlinu a zároveň dokážu oteplovať pôdu, pretože sú schopné absorbovať slnečné paprsky [19].

3.3 Fluorescencia a jej využitie pre štúdium štruktúry HL

Fluorescencia je emisia svetla látkou, ktorá môže nasať pri návrate elektrónu z excitovaného stavu na základný stav. Do okruhu luminiscenčnej spektrometrie patrí: molekulová fluorescenčná spektrometria, molekulová fosforescenčná spektrometria a chemoluminiscenčná spektrometria. Elektrónové stavy väčšiny organických molekúl môžu byť rozdelené na singletové (elektrónový pár má opačný spin) a tripletové (elektrónový pár má rovnaký spin). Po absorpcii ultrafialového žiarenia molekulou dôjde k excitácii elektrónu z ich vibračného stavu na základnej elektrónovej hladine na jednu z mnohých vibračných hladín v elektrónovom excitovanom stave. Väčšinou sa jedná o prvý excitovaný singletový stav. Molekula na vysokej vibračnej hladine pri kolíziach s okolitými molekulami stráca rýchlo energiu a prechádza na nižšiu vibračnú hladinu. Ak nastane prechod na základnú elektrónovú hladinu zo singletového excitovaného stavu pri súčasnom vyžiarení nadbytočnej energie formou emisie fotónov, tak hovoríme o fluorescencii. Hlavnou charakteristikou fluorescencie sú intenzita (počet fotónov prechádzajúcich v danom smere jednotkovou plochou za jednotku času), spektrálne zloženie (spektrálna hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových dĺžok alebo frekvencií), polarizácia (smer kmitania elektrického vektora elektromagnetickej vlny), doba dohasenia (je daná vnútornou dobou života excitovaného stavu, z ktorého dochádza k emisii) a koherenčné vlastnosti (vzťahy medzi fázami svetelných vĺn) [30].

Pre veľké množstvo organických molekúl platí zrkadlová symetria medzi absorpčným a fluorescenčným pásom. Dôvodom je fakt, že absorpcia aj emisia z odpovedajúcich vibračných hladín majú rovnakú relatívnu pravdepodobnosť. Väčšina absorbujúcich a emitujúcich molekúl sa nachádza v rovnovážnom vibračnom stave, pričom vibračná štruktúra základného i excitovaného stavu majú rovnakú štruktúru. Výnimky tejto zrkadlovej symetrie sú väčšinou dôsledkom rozdielného geometrického usporiadania atómových jadier v excitovanom stave oproti usporiadania v základnom stave. Energia emitovaného žiarenia vo forme fluorescencie je menšia alebo rovná absorbovanej energii. Vďaka tomu je posunuté fluorescenčné spektrum danej látky k vyšším vlnovým dĺžkam oproti absorpčnému spektru. Rozdiel v energiách medzi maximami absorpčného a emisného pásu nazývame Stokesov posun (*Obr. 4*) [31].



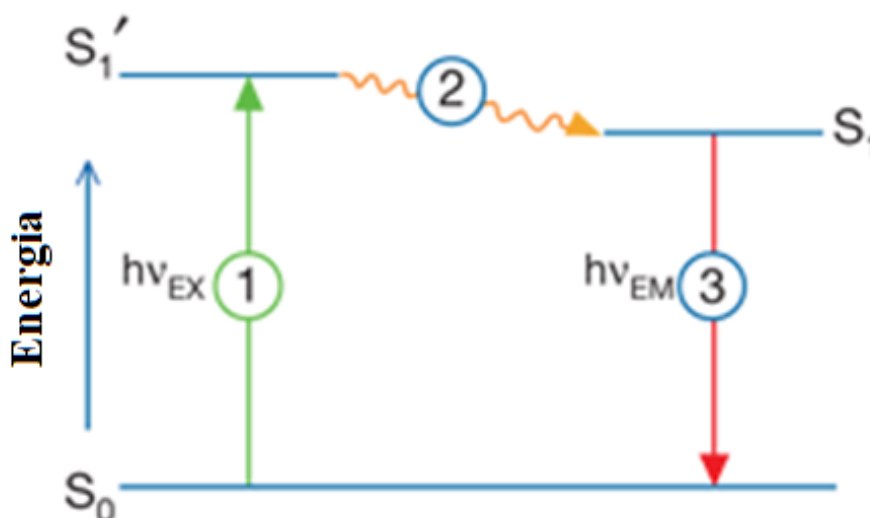
Obr. 4: Ilustrácia Stokesova posunu medzi absorpčným a emisným spektrom fluoroformu

Pri dlhodobom zotrvaní elektrónu v hladine tripletu sa môže molekula prísunom energie znova dostať vo vzbuđeného stavu a objaví sa oneskorená fluorescencia alebo energia tripletového stavu môže byť prenesená na inú molekulu, ktorá potom vysiela žiarenia tzv. senzibilizovanej fluorescencie. Pri fluorescencii sa uplatňuje niekoľko dôležitých zákonov a pravidiel:

- Stokesov zákon: Vlnová dĺžka pri fotoluminiscencii je väčšia alebo rovná vlnovej dĺžke excitačného svetla.
- Vavilovov zákon: Kvantový výtťažok a doba trvania excitovaného stavu zložitých molekúl v roztoku nezávisí na vlnovej dĺžke budiaceho žiarenia. Z toho vyplýva obecná vlastnosť fluorescencie: Emisné spektrá čistých vzorkov sú nezávislé na vlnovej dĺžke excitácie.
- Kashovo pravidlo: Pred emisiou fluorescenčného kvanta dochádza väčšinou k relaxácii vibračnej energie a vnútornej konverzie, takže fluorescenčný prechod nastáva z najnižšej vibračnej hladiny prvého excitovaného stavu S_1 .

Niekedy dochádza k obráteniu spinu excitovaného elektrónu a tým pádom molekula sa dostáva do tripletového excitovaného stavu. Ak pri návrate molekuly do základného vibračného stavu stráca elektrón energiu vo forme fotónu, jedná sa o fosforescenciu. Pôvodne sa oba fenomény odlišovali tým, či sú zistiteľné voľným okom len pri svitu emitujúcej látky alebo i potom, čo svit skončil. Ak emisia žiarenia skončila ihneď so svitom, bolo to označené ako fluorescencia. Ak trvala i po skončení svitu, bol jav označený ako fosforescencia.

Doba trvania tripletového stavu môže byť i väčšia ako 10 s, doba trvania singletového excitovaného stavu je len v rade 10^{-8} – 10^{-5} s. Také žiarenie vyžiarené pri fosforescencii má vyššiu vlnovú dĺžku ako fluorescencčné žiarenie. Na Jablonskom diagrame (Obr. 5) sú zobrazené žiarivé a nežiarivé prechody medzi excitovanými a základnými vibračnými stavmi.



Obr. 5: Jablonského diagram [31]

Vzťah medzi fluorescenciou a fosforescenciou je väčšinou nepriamo úmerný, ak je fosforescencia látky malá, tak intenzita fluorescencie rastie. Všeobecne je intenzita luminiscencie ovplyvnená teplotou, viskozitou prostredia, vlastnosťami rozpúšťadla, aciditou prostredia, koncentráciou vzorky a iné. Fluorescenčné fotometry používajú filtry k vymedzeniu vlnovej dĺžky excitačného a emisného žiarenia. Zložitejšie fluorescenčné spektrofotometry majú dve mriežkové monochromátory. Zdroj žiarenia musí mať dostatočnú intenzitu, často sa používa ortuťová výbojka alebo vysokotlaková xenónová výbojka, prípadne laser [32].

3.3.1 Zhášanie fluorescencie

Pod pojmom zhášanie sa rozumie pokles intenzity fluorescencie dôsledkom rôznych molekulárnych interakcií fluoroforu. Látka spôsobujúca tento pokles je nazývaná zhášač. Ako zhášač fluorescencie funguje množstvo látok, vzdušný kyslík, halogény, ióny ťažkých kovov a pod. Fluorescenčná metóda založená na zhášaní fluorescencie pre štúdium reakcie medzi HK a rôznymi polutantami je využívaná vďaka svojej spoľahlivosti, nízkej časovej náročnosti a relatívnej jednoduchosti [33], [34].

Z hľadiska typu kontaktu medzi fluoroforom a zhášačom sa rozlišuje zhášanie dynamické alebo statické. Pri dynamickom zhášaní dochádza k difúznej interakcii fluoroforu so zhášačom. Po tejto interakcii sa excitovaný fluorofor vracia do základného energetického stavu bez emisie fotónu, čiže nedochádza k žiadnej chemickej zmene molekúl, fluorofor uvoľní absorbovanú energiu bez žiarenia. Pokles intenzity popisuje Stern-Volmerová rovnica, ktorá má rozdielny tvar v dynamickom a statickom zhášaní. V dynamickom má tento tvar:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_D \cdot [Q] \quad (1)$$

kde F_0 a F sú intenzity fluorescencie bez, respektíve so zhášačom, k_q je bimolekulárna zhášacia konštanta, τ_0 je doba života fluorescencie za neprítomnosti zhášača, $[Q]$ predstavuje koncentráciu zhášača a K_D je Stern-Volmerova zhášacia konštanta, ktorá predstavuje citlivosť

interakcie fluoroforu ku zhášaču. Čím väčšia je hodnota tejto konštanty, tým je väčšia pravdepodobnosť difúzneho kontaktu.

Pri statickom zhášaní dochádza k vzniku väzby medzi fluoroforom a zhášačom, čím sa tvorí nesvietivý komplex. Ak tento komplex absorbuje svetelnú energiu, vracia sa ihneď do základného energetického stavu bez emisie fotónov. Interakcia medzi komponentami a vznik väzby je to, čím sa tieto dva typy zhášania líšia od seba. Stern-Volmerová konštanta má rovnaký tvar ako v rovnici **Chyba! Nenašiel sa žiaden zdroj odkazov.**, len v tomto type zhášania je konštanta K_D nahradená konštantou K_S , t.j. asociačná konštanta vzniku komplexu [33]. Jej tvar je nasledovný:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_S \cdot [Q] \quad (2)$$

3.3.2 Fluorescenčná spektroskopia

Analytické techniky založené na štúdiu fluorescencie sú veľmi použiteľné, kvôli ich vysokej citlivosti, selektivite a možnosti časového rozlíšenia. Priamou fluorescenčnou metódou môžeme merať len fluoreskujúce látky. Prístroj pracuje v rozsahu príslušných vlnových dĺžok excitácie a emisie. V prípade nefluoreskujúceho analytu sa využívajú nepriame metódy, ako napríklad zhášanie [34].

Fluorescenčné meranie je rozdelená dva základné typy. Prvým a viac využívaným typom je ustálená (z angl. *steady-state*) fluorescencia. Je realizovaná pri konštantnom osvetľovaní a pozorovaní. Vzorka je ožiarená súvislým lúčom svetla a následne je zaznamenávané emisné spektrum. Druhým typom je časovo rozlíšená (z angl. *time-resolved*) fluorescencia. Je založená na štúdiu poklesu intenzity fluorescencie po časovo obmedzenej excitácii. V súčasnej dobe sa tento typ fluorescencie realizuje pomocou metódy TCSPC (z angl. *Time Correlated Single Photon Counting*), čiže časovo korelovaným sčítaním fotónov [33].

3.3.3 Excitačno-emisné spektrá

Tento spôsob merania ustálenej fluorescencie sa stále používa čoraz viac, hlavne pri analýze zmesí fluoroforov alebo neznámych vzorkov. EEM v spojení s humínovými látkami bolo použité na rozlíšenie pôdnych a vodných humínových látok a k odlišeniu humínových kyselín od fulvínových pochádzajúcich z rovnakého zdroja [35]. Spojenie excitačného a emisného spektra nám umožňuje zistiť presné polohy maxim intenzity fluorescencie, ale zároveň máme k dispozícii celkový obraz celého spektra v daných vlnových dĺžkach, čiže od samostatného emisného alebo excitačného spektra nám EEM spektrá poskytujú viac spektrálnych informácií o analyte.

Intenzita fluorescencie emitovaná vzorkom závisí na použitej excitačnej a emisnej vlnovej dĺžke. EEM obsahuje všetky stacionárne stavy fluorescenčných vlastností fluoroforu a intenzita fluorescencie (I) pri je popísaná týmto vzťahom:

$$I_{ij} = s_i^{ex} \cdot (s_j^{em})^T + e_{ij}, \quad (3)$$

kde s^{ex} a s^{em} sú excitačné a emisné spektrálne vektory a e_{ij} je ich zvyšná chyba, Indexy i a j označujú i -tou excitačnú alebo j -tou emisnú vlnovú dĺžku. V prípade, že spektrum obsahuje niekoľko fluoroforov, tak súhrnná intenzita závisí na súčte intenzít jednotlivých EEM. V maticovom zápise EEM vzorkov môže byť vyjadrená ako $I(n_{ex}, n_{em})$, kde n_{em} a n_{ex} vyjadrujú n excitačných, respektíve emisných vlnových dĺžok. Ich kvadratický rozklad môže byť popísaný touto rovnicou:

$$I = S^{ex} \cdot (S^{em})^T + E, \quad (4)$$

kde matice $S^{ex}(n_{ex}, n_f)$ a $S^{em}(n_{ex}, n_f)$ obsahujú excitačné a emisné spektrá n_f fluoroforov. $E(n_{ex}, n_{em})$ je zvyšná chyba matice popisujúca odchyľky, ktoré nie sú zahrnuté v $(S^{ex} \cdot (S^{em})^T)$ [36].

Ako bolo skôr popísané, humínové látky sú tvorené zo zmesí rôznych organických látok. S cieľom identifikácie, aké štruktúrne komponenty sa nachádzajú v humínových látkach, bolo zrealizovaných veľa štúdií a analýz EEM spektier na zmesi látok, u ktorých sa predpokladalo, že by sa mohli nachádzať v štruktúre humínových látok. Spektrum humínových látok v sebe odráža jednotlivé fluorescenčné príspevky týchto zložiek, tým pádom vzniknutý celkový obraz je plný prekryvov ich emisných a excitačných spektier. Na druhú stranu fluorescencia môže byť dôsledkom intramolekulárných interakcií, pri ktorých dochádza k prenosu náboja z donorových hydroxylových skupín na akceptorové skupiny chinonov. Z tohto dôvodu sa nemôžeme pozerať na fluorescenčné spektrá HL ako len na prekryvy, ktoré sú dôsledkom veľkých množstiev nezávislých fluoroforov. Metóda EEM bola využitá u vodných vzorkov ako pomôcka pri sledovaní humínových látok v riekach alebo ich prímorských deltách. Taktiež sa použila k stopovaniu jednotlivých zložiek HL. Výsledkom bolo že pomocou EEM je schopné určiť nie len potencionalny výskyt odlišných HL, ale EEM je schopná určiť percentuálne zastúpenie v danej zmesi [37], [38].

Medzi nevýhody tohto typu merania patria veľké nároky na čas potrebný na skenovanie celej oblasti a vlnovou dĺžkou obmedzujúca reprodukovateľnosť nameraných dát. Nedá sa ale poprieť prínos veľkého množstva informácií, ktoré nám o danej zmesi dokáže poskytnúť, a tým pádom nám umožňuje mať širší komplexnejší pohľad. V porovnaní s ostatnými metódami je to relatívne rýchla analýza, pretože nám umožňuje počas jedného merania identifikovať celú radu zlúčenín. Veľkou nevýhodou EEM metódy je že rôzne EEM spektrá sú snímané v rôznom čase, čiže toto meranie nie je vhodné pre meranie časovo premennej intenzity fluorescencie. Ak by sme chceli merať časovo rozlíšnú fluorescenciu, potrebovali by sme iný spektrofluorometer a iný laserový zdroj žiarenia. Je ale nutné dodať, že existujú rôzne kombinácie EEM s ďalšími viacrozmernými dátovými analýzami, ktoré umožňuje tnatu čas významne skrátiť [39].

3.3.4 Vnútorý filtračný efekt

Intenzita fluorescencie je priamoúmerná koncentrácii fluoroforu len v určitom rozsahu optických hustôt. V prípade vyššej koncentrácie fluoroforu dochádza k odchyľke od lineárnej závislosti, spôsobené vnútorným filtračným efektom. Tento jav môže znižovať intenzitu excitačného aj emisného žiarenia spätnou absorpciou emitovaného svetla. Kvôli pôsobeniu tohto

efektu je nutné emisné dáta, ktoré sme získali experimentálne, korigovať. Ku korekcii je možné použiť vzťah podľa Lakowiczeho [33], ktorý je definovaný následne:

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{\frac{OD_{ex} + OD_{em}}{2}} \quad (5)$$

kde F_{corr} je korigovaná hodnota nameranej intenzity fluorescence, F_{obs} je nameraná intenzita fluorescence, OD_{ex} je optická hustota pri excitačnej vlnovej dĺžke a OD_{em} je optická hustota pri emisnej vlnovej dĺžke. Ak je optická dráha študovaného vzorku dlhá 1 cm, je možné nahradiť optické hustoty za absorbancie a korekčný vzťah znázornený v rovnici (1) je zmenený na tento tvar:

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}} \quad (6)$$

kde A_{ex} je absorbanca pri excitačnej vlnovej dĺžke a A_{em} je absorbanca pri emisnej vlnovej dĺžke.

4 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

4.1 Metódy vhodné na štúdium medzimolekulových interakcií medzi organickými látkami

Problematike štúdiu ich medzimolekulových interakcií sa venovalo veľa autorov. Vďaka širokej súčasnej ponuky techník štruktúrnej analýzy organických molekúl je v literárnych zdrojov možné nájsť obrovské množstvo príkladov (viz. *Tabuľka 1*) využitých na túto problematiku, od spektroskopických (NMR, FTIR, UV-VIS), zobrazovacích (mikroskopia) až po nepriame nespektroskopické fyzikálno-chemické metódy (kalorimetria).

Tabuľka 1: Metódy využívané na študovanie medzimolekulových interakcií medzi organickými látkami

Metódy:	Analyty:	Zdroje:
Spektroskopia s optickými technikami	Rozhranie kvapalina-kvapalina (voda a organické látky)	[40]
Hydrogénová nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia (¹ H-NMR)	Deltamethrin (DM), monomer akrylamidu (AM)	[41]
Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (FTIR)		
AFM-SMFS (<i>Single-molecule force spectroscopy based on atomic force microscopy</i>)	Cohesin, Dockerin	[42]
SSNMR spektroskopia (<i>Solid-State</i>)	Proteín GB1 (kryštalický a zrazený antitelový komplex)	[43]
UV-VIS spektrofotometria	Binárne zmesi sulfolanu a alkoholov	[44]
Λ-ratiometria (<i>wavelength ratiometry</i>)	BMFC (6-bromomety-2-(2-funaryl)-3-hydroxychromon), FA (2-(6-diteylaminobenzofuran-2-yl)-3-hydroxychromon, 3HC (3-hydroxychromon)	[45]
Izotermálna titračná kalorimetria (ITC)	Proteín tyrozín fosatáza 1B	[46]

Spektroskopia vo všetkých jej formách vykazuje skvelú účinnosť v skúmaní ako metóda, najmä v kombinácii s inými optickými technikami. Za posledných 30 rokov ako technológia postupuje, citlivosť existujúcich techník sa zlepšila. Cieľom práce Pereru a Stevensa bolo zhrnutie použitia spektroskopických metód na štúdium molekulárnych interakcií na rozhraní kvapalina-kvapalina. Medzi spomenutými metódami boli FTIR spektroskopia, UV-VIS spektroskopia, Ramanová spektroskopia s použitím nekonvenčných meriacich techník ako ATR (*attenuated total internal reflection*), TIR (*total internal reflection*), CLM (*centrifugal liquid membrane*), VSF (*vibrational sum-frequency*) a ďalšie iné. V závere poukázali na to, že i keď vďaka spomenutým metódam študovanie rozhrania kvapalina-kvapalina napredovalo, je ešte stále čo dosahovať, aby spektroskopia ako neinvazívna metóda dávala lepší pohľad a overenie hypotéz vyvodenej z výsledkov molekulárneho modelovania. Spektroskopické merania stále poskytujú zaujímavé a úrodné informácie o rozhraní kvapalina-kvapalina [40].

Xie a spol. začali skúmať Deltamethrin (DM), čo je toxický pesticíd, ktorý bol používaný rozšírene na zamedzenie škodcov v poľnohospodárskej produkcii. Cieľom ich práce bolo preskúmať intermolekulárne interakcie medzi vzorkami molekúl DM a funkčným monomérom akrylamidom (AM) pomocou hydrogénovej nuklearnej magneticko rezonančnej spektroskopie ($^1\text{H-NMR}$) a FTIR spektroskopie. Pre meranie síl vodíkových väzieb vytvorených medzi vzorkou a monomérom bola použitá $^1\text{H-NMR}$ spektroskopia. Pri vytvorení vodíkovej väzby dochádza k zníženiu hustoty protónov, ktoré sa podieľajú na jej vytvorení, čo môže spôsobiť paramagnetický chemický posun protónu k oblasti slabšieho poľa (z angl. *downfield*). Čím väčší je chemický posun, tým je silnejšia interakcia medzi vzorkou a monomérom. FTIR spektroskopia, ktorá je užitočná na identifikáciu inkorporovaných funkčných skupín, kvantifikáciu stupňa polymerizácie a stanovenie typov polymerizovateľných skupín prítomných v reaktívnom monoméri, bola využitá na rozoznanie tvorby vodíkových väzieb. Na FTIR spektrách DM-AM komplexov boli zaznamenané posuny píkovo voči spektrám DM a AM, čo potvrdilo prítomnosť vodíkových väzieb v DM-AM komplexoch [41].

Spektroskopické metódy v kombinácii so zobrazovacími technikami sú často používané pre identifikáciu a sledovanie medzimolekulových interakcií, čo ukazuje i článok od Dr. Vera a Carrióna-Vázquez. Tí použili AFM-SMFS na meranie intermolekulárnych síl zapojených do interakcií proteín-proteín na molekulárnej úrovni. Problematikou bol fakt, že existuje nedostatok bežných metód na priamu identifikáciu len intermolekulárnej interakcie počas rozpadu väzby v rámci jednej molekuly. V práci bola popísaný postup na meranie interakcií proteín-proteín pomocou AFM-SMFS, ktorá umožnila priamu identifikáciu píkovo disociačnej sily, zatiaľ čo bola zariadená nemennosť podmienok v danej molekule. Identifikácia danej molekuly je zabezpečená polyproteínovým „fingerprinting“, zatiaľ čo intermolekulárna interakcia je zaznamenaná charakteristickým zvýšením dĺžky obrusu, ktorá bola spôsobená roztrhnutím väzby. Celá stratégia sa demonštrovala interakciou Cohesin-Dockerin [42].

Skúmaniu intermolekulárnych interakcií proteínov sa zaoberal i Lamley a spol., ktorí okrem toho skúmali i proteínové dynamiky (široká škála biofyzikálnych procesov, od enzymatických katalýz a viazanie ligandov až po molekulové rozpoznanie a signalizovanie). Skúmaný bol proteín GB1 v dvoch formách, kryštalický GB1 a zrazený GB1-antitelový komplex. Pre toto skúmanie bola zvolená NMR spektroskopia, presnejšie SSNMR (Solid-State) spektroskopia, ktorá nie je obmedzená malými hodnotami veľkosti a hmotnosti molekúl analytu a teda môžu byť ňou merané biomolekuly s hmotnosťou iba pár stoviek kilodaltonov. Následne boli obidve formy GB1 vystavené veľkou škálou rôznych látok a zrazenín. SSNMR spektrá obidvoch foriem GB1 boli takmer totožné až na pár miestach, ktoré sú pripísané rôznym intermolekulárnym kontaktom s určitými zrazeninami, čo je spôsobené rôznorodosťou foriem proteínu GB1 [43].

Sarijloo a spol. skúmali solvatochromatické parametre celej škály binárnych zmesí sulfolanu a pár alkoholom pomocou UV-VIS spektrofotometrie. Hlavný cieľom bolo skúmanie KAT parametrov α , β , π^* (Kamlet-Abboud-Taft) a Reichardtova škála polarita ($E_T(30)$). Výsledkom bolo zhrnutie závislostí empirických parametrov rozpúšťadiel $E_T(30)$, α , β , π^* na interakcie alkoholov so sulfolanom. Pre prvé tri spomínané parametre sa empiricky zvyšovali so

zvyšovaním po pridávaní alkoholov v binárnych zmesiach sufolanu. Hodnota π^* pre zmesi sa znižovala so zvyšujúcou sa molárnou hmotnosťou alkoholov. Hodnoty $E_T(30)$, α , π^* boli pozitívne v ceom rozsahu zloženia pre všetky binárne zmesi, zatiaľ čo hodnoty β boli negatívne [44].

Demchenko z Akadémie vied v Ukrajine popísal využitie Λ -ratiometrie v štúdiu intermolekulárnych interakcií. Popisuje ju ako jednu z najobľúbenejších metód na štúdium intermolekulárnych interakcií, ktorá umožňuje získanie termodynamických a kinetických parametrov a môže byť použitá v rôznych snímacích a zobrazovacích technológiách. V porovnaní s jednoduchým zaznamenaním intenzity umožňuje zabrániť mnohým technickým problémom a naopak umožňuje realizáciu mnoho nových možností. Vo svojej práci sa zameril na sledovanie praktických aspektov Λ -ratiometrických snímaní s použitím jednoduchých, dvoj a multiflorescenčných žiarivcov, ktoré sú založené na rôznych mechanizmoch. Každý mechanizmus produkuje charakteristické spektroskopické zmeny. Nakoniec bolo popísaných niekoľko príkladov úspešného uplatnenia tejto metódy, ako napríklad v štúdiu interakcií nukleových kyselín, viazanie ligandov na proteíny, konformačné zmeny v interakcii proteín-proteín. Popísané boli vyhlídky na ďalší rozvoj, kedy by sa dala použiť Λ -ratiometria s ďalšími metódami na rôzne zaujímavé výskumy a aplikácie [45].

Leavitt a Freire sa zamerali na izotermálnu titračnú (ITC) kalorimetriu a na jej využitie v štúdiu tvorby väzieb ligandov na proteíny. ITC sa často používa na štúdiu naväzovania malých molekúl na proteíny, ale taktiež môže byť neoceniteľnou pomôckou k štúdiu interakcií proteín-proteín. Tieto výhody ITC využili autori k väčšiemu pochopeniu týchto procesov, aby mohli získať užitočné informácie ako napríklad interakcia doména-doména, rozpoznanie proteínov, väzba protilátka-receptor a ich membránové splynutie. ITC je technika ktorá môže vyriešiť entalpické a entropické zložky väzbovej afinity. Pretože tieto zložky súvisia s konštrukčnými parametrami, môžu byť použité ako pomôcka k molekulovému dizajnu. Môžu slúžiť na overenie výpočtov o štruktúre založenej na výpočtovej predpovedi väzbovej energetiky a ako spôsob rozvoj precíznej štruktúry / energetickej korelácie. S časom ako sa zlepšuje spoľahlivosť, citlivosť a presnosť inštrumentácie ITC, očakáva sa jej vzrast dôležitosti v intramolekulárnom dizajne vo všeobecnosti a čiastočne i v dizajne drog a omamných látok [46].

4.2 Interakcie humínových látok s rôznymi látkami

Mnoho autorov prispelo svojimi prácami k interakciám humínových látok so širokou škálou látok (napr. farbivá, tenzidy, biocidy, farmaceuticky zaujímavé látky, a pod.) do celkového stavu poznania. To svedčí, že každá vedecká spoločnosť má záujem o humínové látky a ich využitie vo svojich odvetviach.

Tabuľka 2: Metódy využívané na študovanie interakcií humínových kyselín

Metódy:	Interagovaná látka s HL:	Zdroje:
Fluorescenčná spektroskopia	chróm (VI) vo forme $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	[47]
	zinočnaté ióny	[48]

	Tricyklické antidepresíva	[49]
CFM (chemical force microscopy)	Substráty odstránene počas čistenia vody	[50]
Zhášanie fluorescencie	Polyaromatické uhl'ovodíky, triazoly série fungicídy	[51]
Molekulárna fluorescenčná spektrometria	naftalén	[52]
IFTR spektroskopia	zinočnaté ióny	[48]
Štúdium uvoľňovania protónov		
UV-VIS absorpcia	chróm (VI) vo forme $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	[47]
FTIR spektroskopia	fosfátové hnojivá (PHA)	[53]
NMR spektroskopia		
X-ray fotoelektrónová spektroskopia		

Gu a spol. študovali väzbovú interakciu chrómu (VI) vo forme $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ s humínovou kyselinou pomocou UV-VIS absorpcie a fluorescenčnej spektroskopie. Fluorescenčné spektrálne údaje poukázali na väzbovú interakciu medzi $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ a humínovou kyselinou a pomocou údajov sa zhotovila väzbová konštanta. Nárast teploty spôsobil pokles hodnoty väzbovej konštanty humínovej kyseliny s $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. Termodynamická analýza ukázala, že do procesu väzby pri pH 6,5 boli zapojené multi-intermolekulárne sily vrátane vodíkových väzieb, hydrofóbnich a elektrostatických síl. Spektrálne údaje tiež naznačili, že $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ovplyvňovali štruktúry aromatických jadier v humínovej kyseline. Ďalej analýza molekulárneho modelovania ukázala, že pri väzbe s $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ s HK hrali kľúčovú úlohu veľa reaktívnych skupín a väzbových dutín v štruktúre HK [47].

Boguta a spol. študovali interakcie medzi humínovými kyselinami, ktoré boli získané z rozličných zdrojov, a iónmi zinku. Na štúdium boli použité rôzne metódy, ako napríklad fluorescenčná spektroskopia, infračervená spektroskopia alebo štúdium uvoľňovania protónov. Pri všetkých metódach sa študovali faktory vplývajúce na interakciu. Pri fluorescenčnej spektroskopii sa skúmal zdroj humínových kyselín, koncentrácia zinočnatých iónov, pH prostredia. Pri infračervenej spektroskopii porovnávali FTIR spektrá HK a HK-Zn komplexov, ktoré poskytli dodatočné informácie o štruktúrnych zmenách v interakcii. Pri poslednej spomínanej metóde, štúdiu uvoľňovania protónov, sa zistilo, že pri klesaní pH roztoky HK pri zvyšovaní koncentrácie Zn nastáva výmena protónov a chemických interakcií medzi nedisociovanými funkčnými skupinami HK a iónmi kovov [48].

4.2.1 Interakcie humínových látok s organickými látkami

Mordvinova a spol. skúmali medzimolekulárne interakcie medzi humínovými látkami (HS) a tricyklickými antidepresívami (TA), amitriptylínom, nortriptylínom, imipramínom a desipramínom, sa prvýkrát zistili pomocou fluorescenčnej spektroskopie. Na vysvetlenie fotodegradácie TA molekúl spôsobenej fotolýzou humínových látok slnečným žiarením boli navrhnuté dva najjednoduchšie modely predpokladajúce koordináciu jednej alebo dvoch molekúl TA vo väzbových centrách HS [49].

Tchaikovskaya a spol. metódou zhášania fluorescencie skúmali interakciu humínových kyselín s polyaromatickými uhl'ovodíkmi (PAH) a triazolmi série fungicídov (cyprokonazol a tebukonazol) v závislosti od koncentrácie látok v roztokoch a ich štruktúrnych vlastností.

Humínové kyseliny sa modifikovali mechanicko-chemickou aktiváciou v planetárnom mlyne. V komplexe modifikovaných HK a PAH s fungicídmi sa preukázali intermolekulárne interakcie medzi komponentami, ako napríklad donor-akceptorové a hydrofóbne väzby. Pomocou ChemOffice CS Chem3D 8.0 založený na metódach molekulárnej mechaniky a molekulárnej dynamiky boli odhalené termodynamicky stabilné konformácie molekúl biocidov. Molekuly biocidov s pH 7 sú v energeticky priaznivej polohe, keď sú benzénové a triazolové jadrá navzájom takmer rovnobežné. I po okyslení roztokov na pH 4,5 si molekula cyprokonazolu (CC) zachováva konformáciu, pre ktorú sú možné interakcie donor-akceptor: benzénové jadro v molekule HK predstavuje donor elektrónov a triazol je akceptor. V tomto prípade sa elektrónová hustota v CC redistribuuje ľahšie ako na tebukonazole (TC), čo môže byť spôsobené menším počtom atómov uhlíka medzi CC triazolovými a benzénovými jadrami. Triazolové jadro TC je vo väčšej miere protónované, čím získava pozitívny náboj a vstupuje do interakcií donor-akceptor so vzorkami humínovej kyseliny. Vyššie uvedené typy väzieb umožňujú HK aktívne sa zúčastňovať na sorpčných procesoch a zabezpečovať ich interakciu s biocidmi a PAH, a teda pôsobiť ako detoxikačné činidlá na rekultiváciu znečisteného prostredia [51].

V migrácii znečisťujúcich látok z ľudského odpadu do vodného životného prostredia hrá veľmi dôležitú úlohu rozpustená organická hmota. V štúdiu, ktorú zrealizoval Tarasenko a spol., bol použitím fluorescenčných zhášacích titracií zaznamenaný vplyv HK na fotochemickú transformáciu naftalénu spôsobenou ožarovaním modelového slnečného žiarenia a UV žiarenia. Po ožarovaní sa vypočítali parametre interakcie medzi naftalénom a HK. Zistilo sa, že molekulárny komplex HK a naftalénu je stabilnejší voči UV žiareniu v porovnaní s modelovým slnečným žiarením. Došli k záveru, že molekulárna fluorescenčná spektrometria je užitočným citlivým nástrojom na hodnotenie intermolekulárnych interakcií HA a naftalénu [52].

Jing a spol. analyzovali kompozičné a štruktúralne zmeny HK v kombinácii s fosfátovým hnojivom (PHA). Výskum sa zaoberal účinkami PHA na rast kukuričných sadeníc so štyrmi rôznymi koncentraciami HK. Na výskum boli použité FTIR a NMR spektroskopie, následne Rentgenová fotoelektrónová spektroskopia. Spektrá FTIR a NMR naznačovali, že relatívny obsah karboxylovej skupiny v PHA bol vyšší ako v HK. X-ray Photoelektronická spektroskopia ukázala, že relatívne množstvo väzieb C-C v PHA bolo nižšie ako v HK, zatiaľ čo počet väzieb C-H bol opačný. Nakoniec dospeli k záveru, že v porovnaní s HK, PHA však vykazoval horší účinok pri podpore rastu a absorpcie dusíka, fosforu a draslíka kukuricami. Tento horší účinok by mohol byť pripisovaný zlej hydrofilnosti a nevhodnému množstvu PHA [53].

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Použité chemikálie

- Humínové kyseliny (IHSS štandard izolovaný z Leonarditu)
- Metylované humínové kyseliny (IHSS štandard izolovaný z Leonarditu)
- Hydroxid sodný o čistote $\geq 98\%$, Penta
- Deionizovaná voda (PureLab)
 - *Voda bola pripravovaná prístrojom pre prípravu deionizovanej vody PureLab*
- fosfátový pufor o pH 6,9-7
 - *Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát*
 - *Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát*
 - *Deionizovaná voda (PureLab)*
- Septonex

5.2 Použité prístroje a pomôcky

- Analytické váhy HR-120-EC, a & D Instruments Ltd.
- Spektrofotometer UV-VIS HITACHI U-3900H
- Fluorescenčný spektrometer Horiba FluoroLog®
- bežné laboratórne sklo a laboratórne vybavení
- High Precision Cell (vyrobená Quartz SUPRASIL)
- Prístroj pre prípravu deionizovanej vody PureLab
- Potenciometrický titrátor 888 Titrand Metrohm s magnetickým miešadlom 801 Stirrer Metrohm

5.3 Software pre zpracovanie a interpretáciu dát

- UV-VIS_Spektrometr.exe
- Fluorescence.exe
- Tiamo.exe
- Origin9
- OriginLab
- Microsoft Office Excel
- Microsoft Office Word

5.4 Selektívna metylácia humínových kyselín

Časť IHSS HK bola podrobená selektívnej metylácii. Dôvodom bolo porovnanie a štúdium vplyvu tejto modifikácie na interakcii s modelovým organickým iónom. Do ôsmich kadičiek bolo navážené vždy po 2 g IHSS HK a ku každému množstvu bolo pipetovaných 8 ml chloroformu a 4 ml metanolu. Následne bolo do každej kadičky po kvapkách pridávaných 8 ml TMS-DM v hexáne. Zmesi boli miešané 2 hodiny na magnetickej miešačke v digestory a následne bolo do každej kadičky pridaných 1,5 ml TMS-DM. Metylované HK sa najprv sušili v digestory pri laboratórnej teplote cez noc a následne boli premiestnené na Petriho misky a sušené v sušiarňi pri 40 °C. Sušenie prebiehalo dovtedy, kým sa z mHK neodparilo nezreagované metylačné činidlo. Touto modifikáciou došlo k esterifikácii karboxylových skupín v štruktúre HK.

5.5 Laboratórny postup

5.5.1 Ustálená fluorescenčná spektroskopia

5.5.1.1 Príprava vzoriek humínových kyselín so Septonexom

Pre experiment sa pripraví zásobný roztok IHSS HK s koncentráciou 0,1 g/l rozpustením príslušného množstva v 0,01 M NaOH. Rovnako sa postupovalo v prípade mHK. Následne sa vytvoria dve sady vzoriek do odmerných baniek s objemom 25 ml. Vo všetkých sadách bude zastúpené množstvo HK, a mHK, s výslednou koncentráciou 0,01 g/l. K druhej sade vzoriek sa k HK, a mHK, pridalo množstvo daného zástupcu organických xenobiotík (Septonex) podľa *Tabuľka 3*. Vzorky boli doplnené fosfátovým pufrum po rysku. Zásobný roztok zástupcu organických xenobiotík (Septonex) s koncentráciou 0,1 g/l sa pripraví rozpustením príslušného množstva v deionizovanej vode.

Tabuľka 3: Príprava meracích vzoriek HK, mHK so Septonexom do EEM metódy

roztok	Množstvo [ml]		
	HK	mHK	Septonex
HK	2,5	X	X
HK+Sep 10/1	2,5	X	0,25
HK+Sep 5/1	2,5	X	0,5
HK+Sep 2/1	2,5	X	1,25
HK+Sep 1/1	2,5	X	2,5
HK+Sep 1/2	2,5	X	5,0
HK+Sep 1/5	2,5	X	7,5

mHK	X	2,5	X
mHK+Sep 10/1	X	2,5	0,25
mHK+Sep 5/1	X	2,5	0,5
mHK+Sep 2/1	X	2,5	1,25
mHK+Sep 1/1	X	2,5	2,5
mHK+Sep 1/2	X	2,5	5,0
mHK+Sep 1/5	X	2,5	7,5

5.5.1.2 *Príprava vzoriek modelových látok so Septonexom*

Roztoky modelových sloučenin boli pripravené presne naváženým množstvom modelovej zlúčeniny na konečnú koncentráciu 0,1 g/l. Navážka bola kvantitatívne prevedená do odmernej banky s objemom 200 ml doplnená destilovanou vodou po rysku. Zásobný roztok zástupcu organických xenobiótík s koncentráciou 0,1 g/l sa pripravil rozpustením príslušného množstva v deionizovanej vode. Následne podľa *Tabuľka 4* boli pripravené meriace vzorky do odmerných baniek s objemom 25 ml a doplnené deionizovanou vodou po rysku.

Tabuľka 4: Príprava vzoriek modelových látok so Septonexom do EEM metódy

roztok	Množstvo [ml]		
	Gallic acid	Pyrogallol	Septonex
kyselina gallová	2,5	X	X
Gallova+Sep 1/1	2,5	X	2,5
Gallová+Sep 1/2	2,5	X	5,0
Pyrogallol	X	2,5	X
Pyrog+Sep 1/1	X	2,5	2,5
Pyrog+Sep 1/2	X	2,5	5,0

5.5.1.3 Analýza vzoriek

Pripravené sady vzoriek sa následne aplikujú do kremennej fluorescenčnej kyvety a ich excitačné a emisné spektrá budú merané pomocou fluorescenčného spektrometra Horiba FluoroLog®. Nastavenie spektrometra je nasledovné:

- Excitačné maximum: 280 nm
- Emisné maximum: 450 nm
- Šírka štrbín: 5 nm
- Optická dráha: 1 cm
- Rozsah excitačného spektra: 240 – 550 nm
- Rozsah emisného spektra: 300 – 600 nm
- Krok: 5 nm
- IHR 320 (detekcia): vypnuté
- Nastavené formuly: T1, R1, T1/R1, T1c/R1c

5.5.1.4 Korekcia excitačných a emisných spektier

Z dôvodu možného vplyvu vnútorného filtračného efektu na excitačné a emisné spektrá sa pri získaných intenzitách fluorescencie prevedie korekcia. K zisteniu požadovaných absorpcií meraných vzoriek sa použije UV-VIS spektrofotometer HITACHI U-3900H s nastaveným rozsahom vlnových dĺžok 600 – 240nm, s krokom 1 nm a šírkou medzery 4 nm. Získané absorpčné spektrá sa exportujú v podobe dokumentu MS Excel.

5.5.1.5 Výpočet a vyjadrovanie výsledkov

Po zistení požadovaných absorpcií sa na hodnotách fluorescencie prevedie korekcia podľa rovnice (6). Pomocou upravených hodnôt fluorescencie sa vytvoril v programe OriginLab excitačno-emisné spektrá.

5.5.2 Stanovenie celkovej, karboxylatovej a fenolickej kyslosti

Pre stanovenie celkovej kyslosti je možné využiť priamu alebo spätnú titráciu. V tejto práci bola použitá spätná titrácia, pomocou ktorej bola stanovená celková kyslosť (7). Vypočítali sme ju podielom súčinu koncentrácie titračného činidla, v našom prípade kyselina chlorovodíková (c_{HCl}), a rozdielu objemov (ΔV_{HCl}), v ktorých sa nachádzal bod ekvivalencie, s navážkou použitej humínovej látky (m_{vz}).

$$n_{H^+_{celková}} = \frac{c_{HCl} \cdot \Delta V_{HCl}}{m_{vz}} \quad (7)$$

Následne bola získaná karboxylátová kyslosť (8) využitím nepriamej metódy s octanom vápenatým. Vypočítali sme ju podielom súčinu koncentrácie titračného činidla, v našom

prípade hydroxid sodný (c_{NaOH}), a objemu (ΔV_{NaOH}), v ktorom sa nachádzal bod ekvivalencie, s navážkou použitej humínovej látky (m_{vz}).

$$n_{H^+_{karboxylátová}} = \frac{c_{NaOH} \cdot \Delta V_{NaOH}}{m_{vz}} \quad (8)$$

Fenolická kyslosť bola následne dopočítaná ako rozdiel celkovej a karboxylátovej kyslosti (9).

$$n_{H^+_{fenolická}} = n_{H^+_{celková}} - n_{H^+_{karboxylátová}} \quad (9)$$

5.5.2.1 Spätná titrácia

Navážka HK bola rozpustená v 100 ml 0,01M NaOH a je miešaná po dobu 24 hodín na magnetickej miešačke. Následne bola vzorka titrovaná 0,05M HCl s prídavkom 0,1 ml·min⁻¹. Titrácia bola ukončená, keď sa dosiahol finálny objem kyseliny tzn. titračného činidla 60 ml.

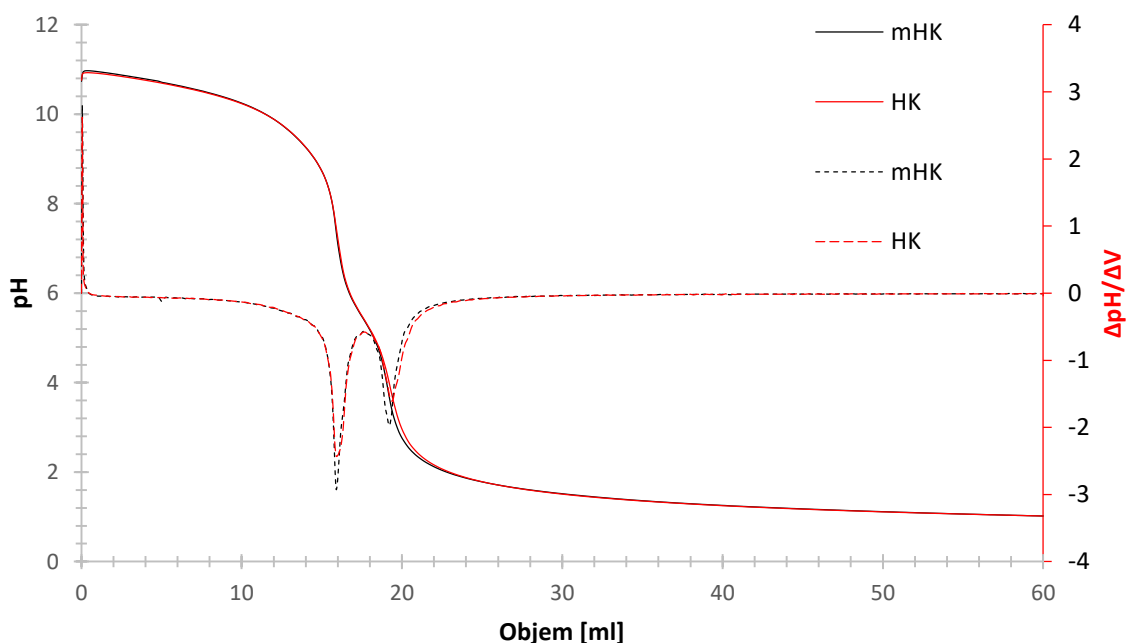
5.5.2.2 Karboxylátová titrácia

Navážka vzorky bola kvantitatívne prevedená do 40 ml roztoku octanu vápenatého s koncentráciou 0,5 mol·dm⁻³ a 10 ml destilovanej vody. Zmiešaním 40 ml octanu vápenatého a 60 ml destilovanej vody vznikol blank. Blank i stanovovaná vzorka boli miešané 24 hodín na magnetickej miešačke a nasledujúci deň prefiltrované cez papierový filtračný papier do 100 ml odmernej banky a doplnené destilovanou vodou po rysku. Vzorky boli titrované 0,1M NaOH s prídavkom 0,1 ml·min⁻¹, titrácia bola ukončená po konečnom prídavku 10 ml titračného činidla.

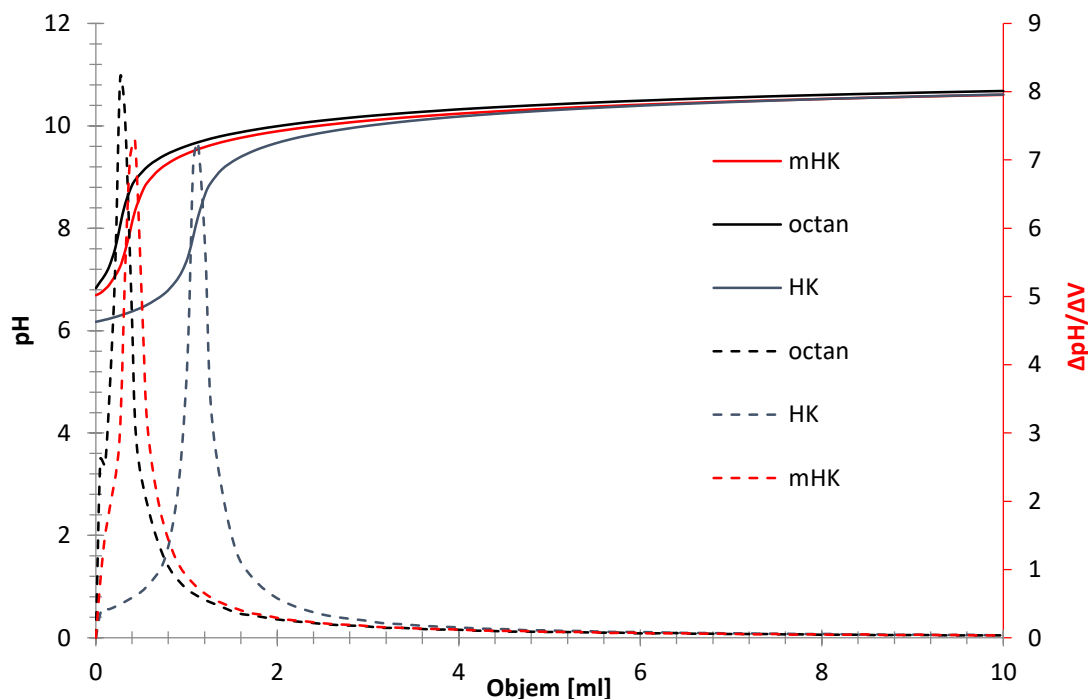
6 VÝSLEDKY A DISKUSIA

6.1 Porovnanie humínových kyselín s ich metylovanou modifikáciou

Na určenie obsahu neobsadených karboxylových skupín v metylovaných humínových kyselinách sa zvolili potenciometrické titrácie, pomocou ktorých vieme stanoviť karboxylátovú, fenolickú a celkovú kyslosť. Vzorky humínových kyselín a metylovaných humínových kyselín boli pripravené podľa návodu viz. *kapitola 5.5.2*. Pomocou spätnej titrácie bola stanovená celková kyslosť HK a mHK (7) a karboxylátovej titrácie bola stanovená karboxylátová kyslosť (8). Fenolická kyslosť bola následne dopočítaná rozdielom karboxylátovej kyslosti od celkovej (9). Na *Obr. 6* **Chyba! Nenašiel sa žiaden zdroj odkazov.** a *Obr. 7* **Chyba! Nenašiel sa žiaden zdroj odkazov.** sú znázornené titračné krivky spätnej a karboxylátovej titrácie, v *Chyba! Nenašiel sa žiaden zdroj odkazov.* sú uvedené vypočítané hodnoty celkovej, karboxylátovej a fenolovej kyslosti na jednotku navážky ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$). Na *Obr. 6* je malý rozdiel medzi bodami ekvivalencie spôsobený tým, že navážka metylovaných humínových kyselín bola oproti navážke nemodifikovných humínových kyselín približne trikrát väčšia.



Obr. 6: Titračná krivka spätnej titrácie HK a mHK



Obr. 7: Titračná krivka karboxylátovej titrácie octanu, HK a mHK

Tabuľka 5: Kyslosť HK a mHK

Typ HL	Kyslosť [$\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$]		
	celková	karboxylová	fenolová
HK	7,92	3,94	3,98
mHK	5,10	0,46	4,64

Môžeme si všimnúť, že v metylovanej modifikácii došlo k poklesu množstva pôvodných karboxylových skupín v modifikovaných humínových kyselinách až na približne 12 %, čo z nej robí modifikáciu vhodnú na skúmanie vplyvu karboxylových skupín na interakciu HK-xenobiotikum, ale i na samotný vplyv na štruktúru a vlastnosti humínových kyselín, hlavne na ich aromatickú kostru.

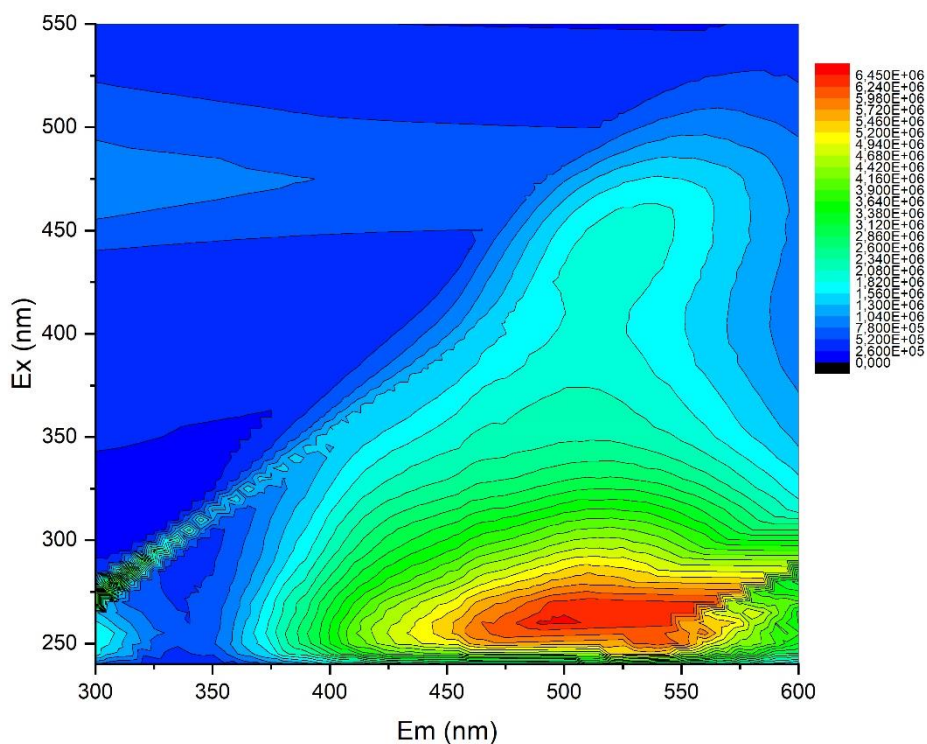
6.2 Štruktúrne aspekty interakcie humínových kyselín so xenobiotikom

Cieľom tejto práce bolo zvoliť vhodný modelový systém (HL + Septonex) a metodiku štúdií interakcií, ktoré medzi obidvoma zložkami systému prebiehajú. Následne realizovať série experimentov za účelom komplexnej štruktúrnej charakterizácie interakcií HK-Septonex a diskutovať nové poznatky o štruktúrnych aspektoch interakcií medzi HL a organickými iónmi.

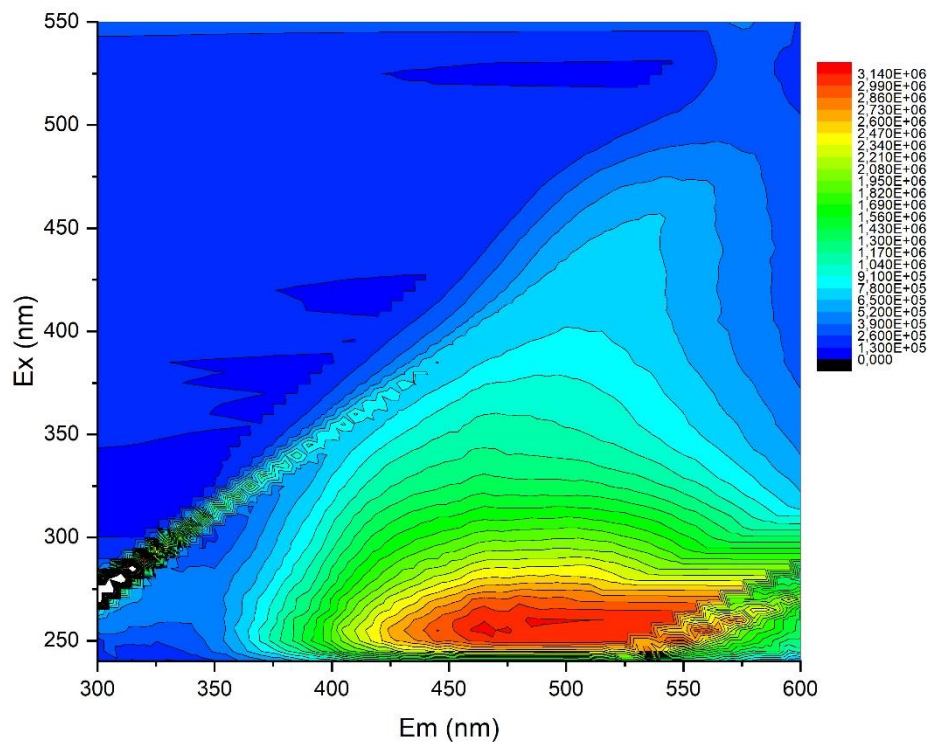
Na štúdium tejto interakcie bola použitá EEM metóda, keďže spojením excitačných a emisných spektier vieme pozorovať celkový obraz a všetky maximá neznámych látok. Pre humínové kyseliny platí, že ich štruktúra závisí na pôvode a typu spracovania, a je takmer

nepravdepodobné nájsť dve rovnaké „molekuly“ HK. Nevieme dopredu určiť, kde má daná „molekula“ HK svoje emisné a excitačné maximum. Preto pomocou EEM spektier môžeme vidieť celkový obraz excitačného a emisného spektra a sledovať, či po interakcii so Septonexom nastane nejaká zmena EEM spektra.

Na *Obr. 8* môžeme vidieť, že štandard HK, ktorý používame, má jedno emisné maximum, na ktorom bude možné sledovať interakciu so Septonexom. Na *Obr. 9* je možné si povšimnúť, že mHK majú toto maximum posunuté, ale stále má jedno emisné maximum.

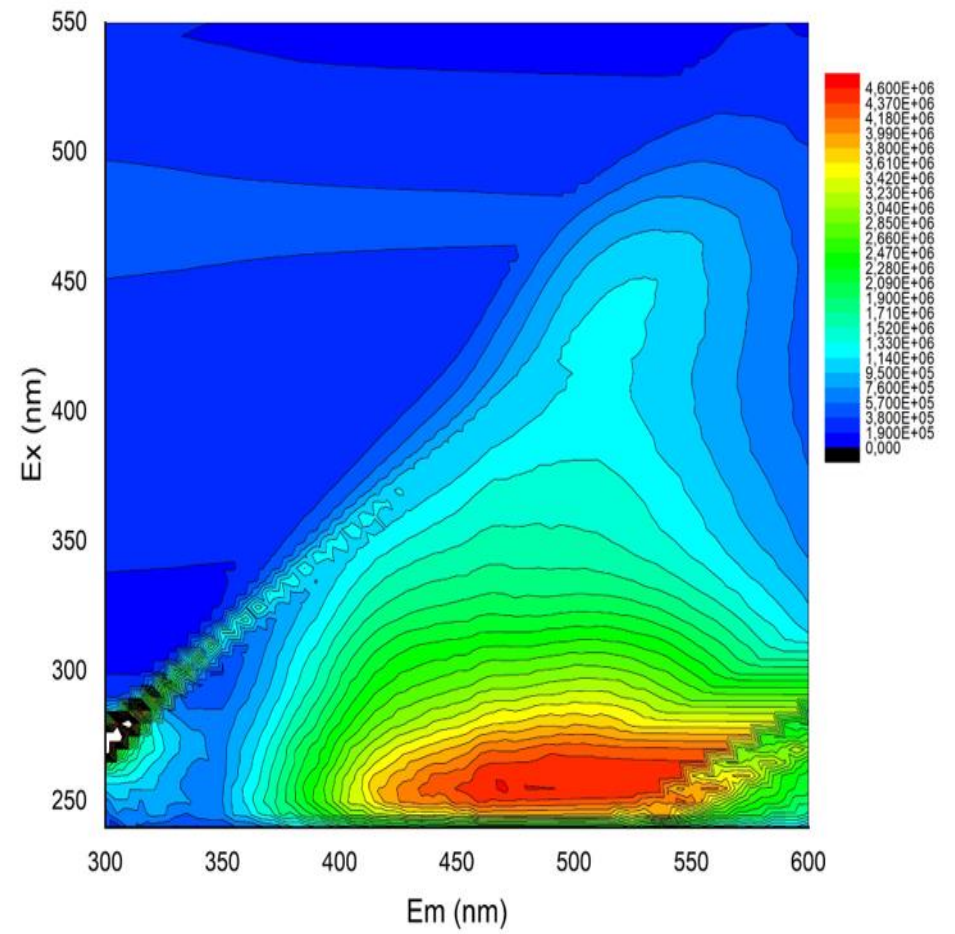
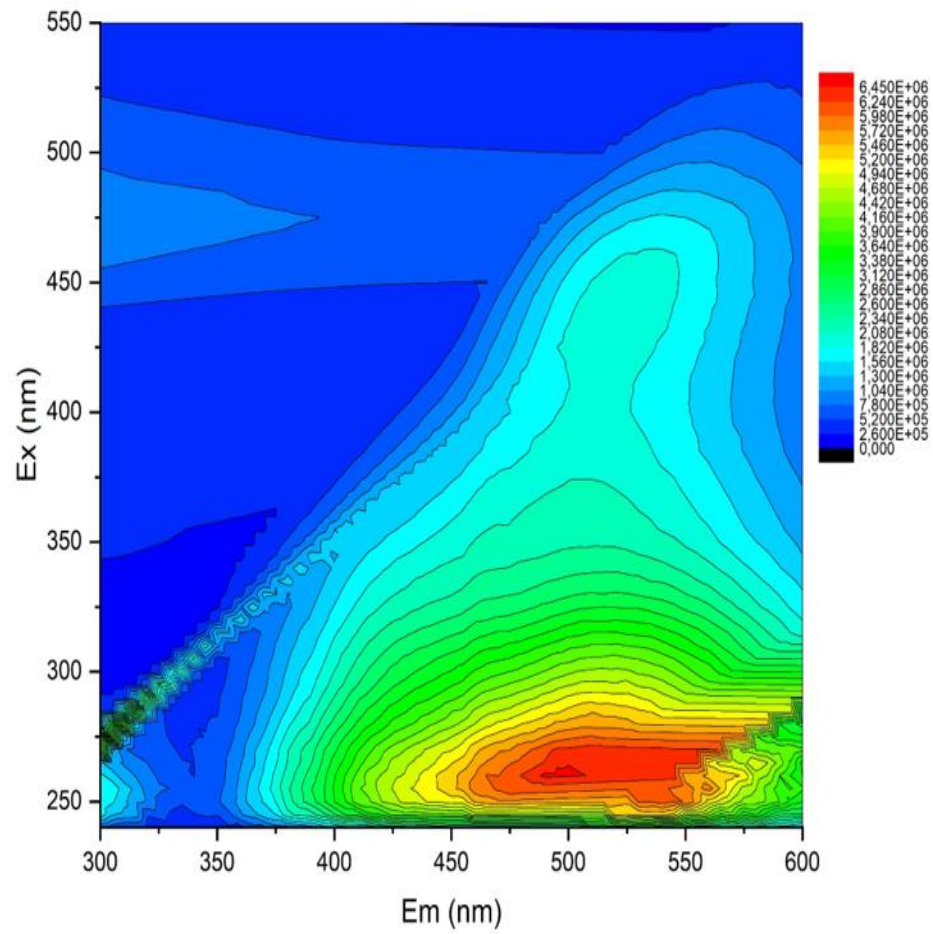


Obr. 8: EEM spektrá HK

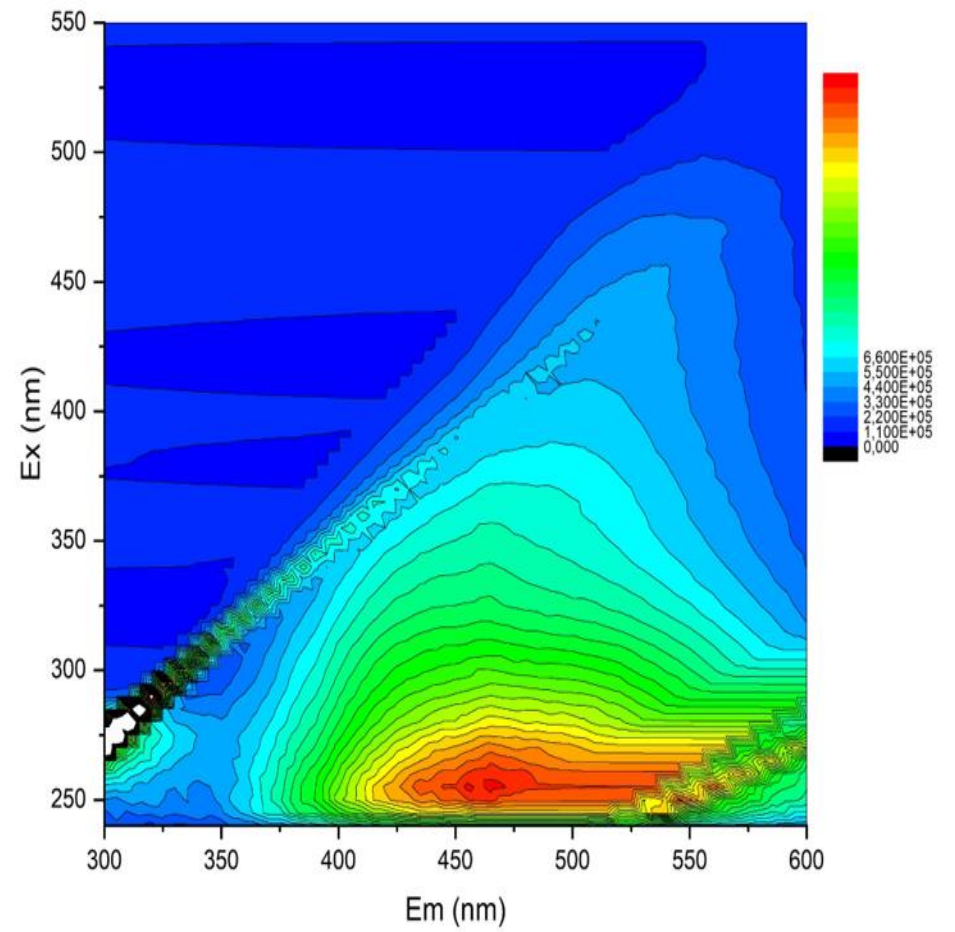
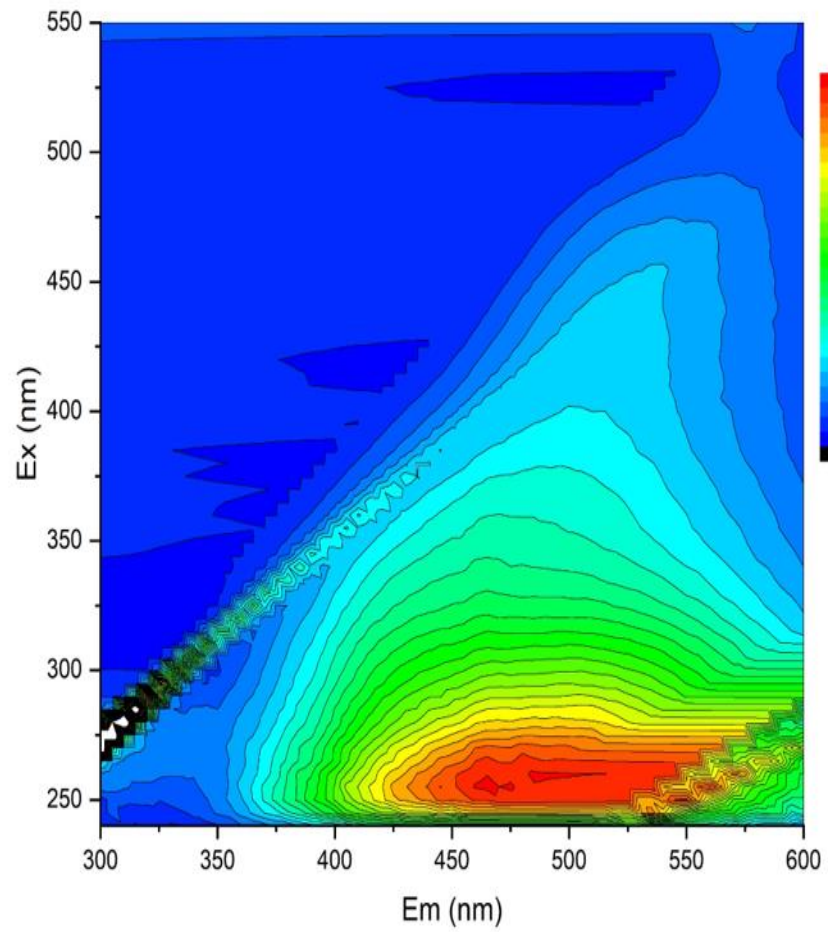


Obr. 9: EEM spektrá mHK

Ako u Tchaikovskaya a spol. [51], i v tejto práci sa prejavila interakcia HK-Septonex zhášaním fluorescencie (Obr. 10) emisného maxima. Okrem toho sa interakcia prejavila posunom tohto emisného maxima k nižším vlnovým dĺžkam. Nastal tzv. modrý posun. Táto interakcia bola rovnako prejavená i medzi mHK a Septonexom, ako môžeme vidieť na Obr. 11. To nás posúva k otázke, ake interakcie nastávajú v komplexe HK-Septonex, respektíve mHK-Septonex. V humínových kyselinách sú hlavnými funkčnými skupinami karboxylové a fenolové skupiny. Preto sa v tejto práci používa metylovaná modifikácia humínových kyselín, kde sú esterifikáciou obsadené karboxylové skupiny. Keďže nám prebieha rovnaká interakcia v komplexe HK-Septonex i mHK-Septonex, môžeme predpokladať, že Septonex interaguje s aromatickými jadrami v štruktúrach humínových látok.

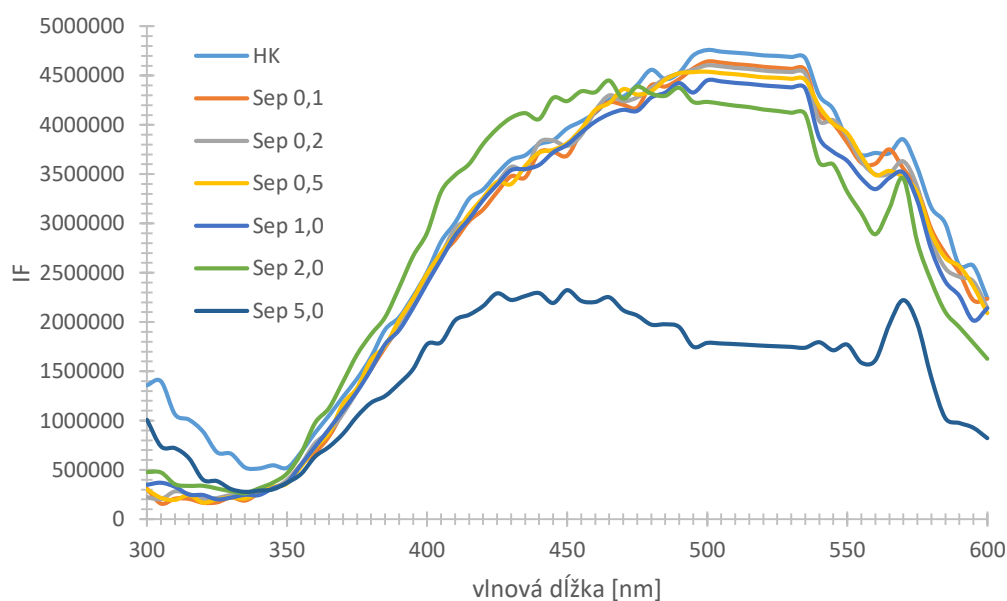


Obr. 10: Porovnanie EEM spektier HK (naľavo) a HK so Septonexom s koncentraciou Septonexu 0,001 g/l (napravo)

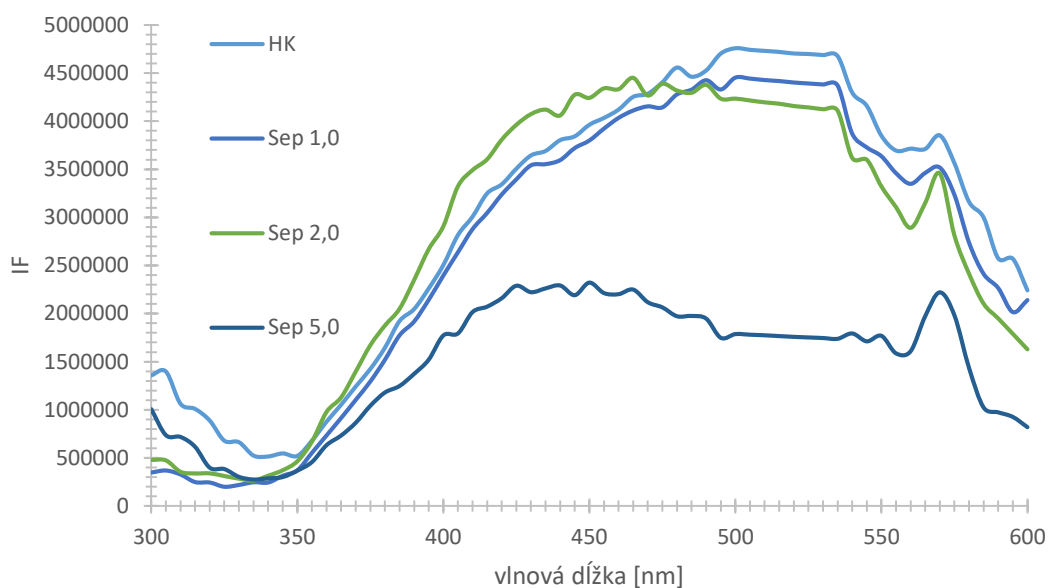


Obr. 11: Porovnanie EEM spektier mHK (naľavo) a mHK so Septonexom s koncentraciou Septonexu 0,001 g/l (napravo)

Ďalším krokom bolo určiť, v akom koncentračnom pomere HK/Septonex (alebo mHK/Septonex) bude ideálne pozorovať interakciu medzi HK, respektíve mHK, a Septonexom. Preto bola zostavená koncentračná rada (viz. *kapitola 5.5.1.1*) od vzoriek samotnej HK (mHK) bez Septonexu, až po vzorku, v ktorej koncentrácia Septonexu bola päťnásobne väčšia ako koncentrácia HK, respektíve mHK. Výsledné EEM spektrá sú zobrazené viz. *Príloha 1 až Príloha 16*. Pre lepší prehľad boli zostavené emisné spektrá s fixnou excitačnou vlnovou dĺžkou (260 nm), získanou zo všetkých EEM spektier. Na *Obr. 12* môžeme vidieť, že zhasenie HK Septonexom je závislé na koncentrácii. To isté zaznamenal i Boguta a spol. [48] pri interakcii humínových kyselín s iónmi zinku, kde pri rastúcej koncentrácii zinočnatých iónov v komplexe HK-Zn²⁺ bol zhasiaci trend rastúci. I na týchto excitačných spektrách si môžeme povšimnúť modrý posun emisného maxima, kedy emisné maximum HK (500 nm) je zhasané a tým pádom vznikajú nové maximá v nižších vlnových dĺžkach. Pre lepší prehľad bol vytvorený graf, ktorý je znázornený na *Obr. 13* **Chyba! Nenašiel sa žiaden zdroj odkazov.**, kde bol zhasiaci trend najväčší. Rovnaký zhasiaci trend nastal i v prípade metylovanej modifikácie HK, viz. *Príloha 17 a Príloha 18*.

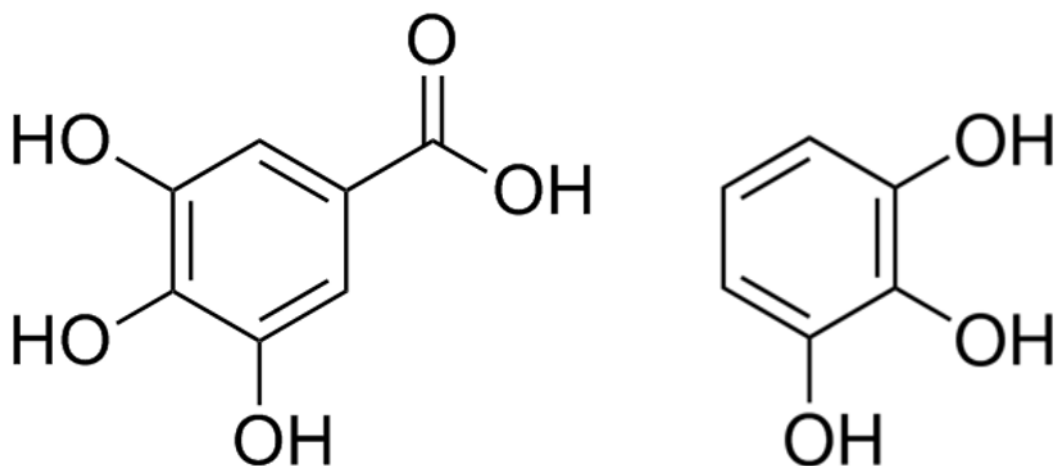


Obr. 12: Emisné spektrá HK a HK-Septonex zmesí s rôznymi koncentračnými pomermi HK/Septonex



Obr. 13: Emisné spektrá HK a HK-Septonex s koncentračnými pomermi HK/Septonex 1/1, 1/2 a 1/5

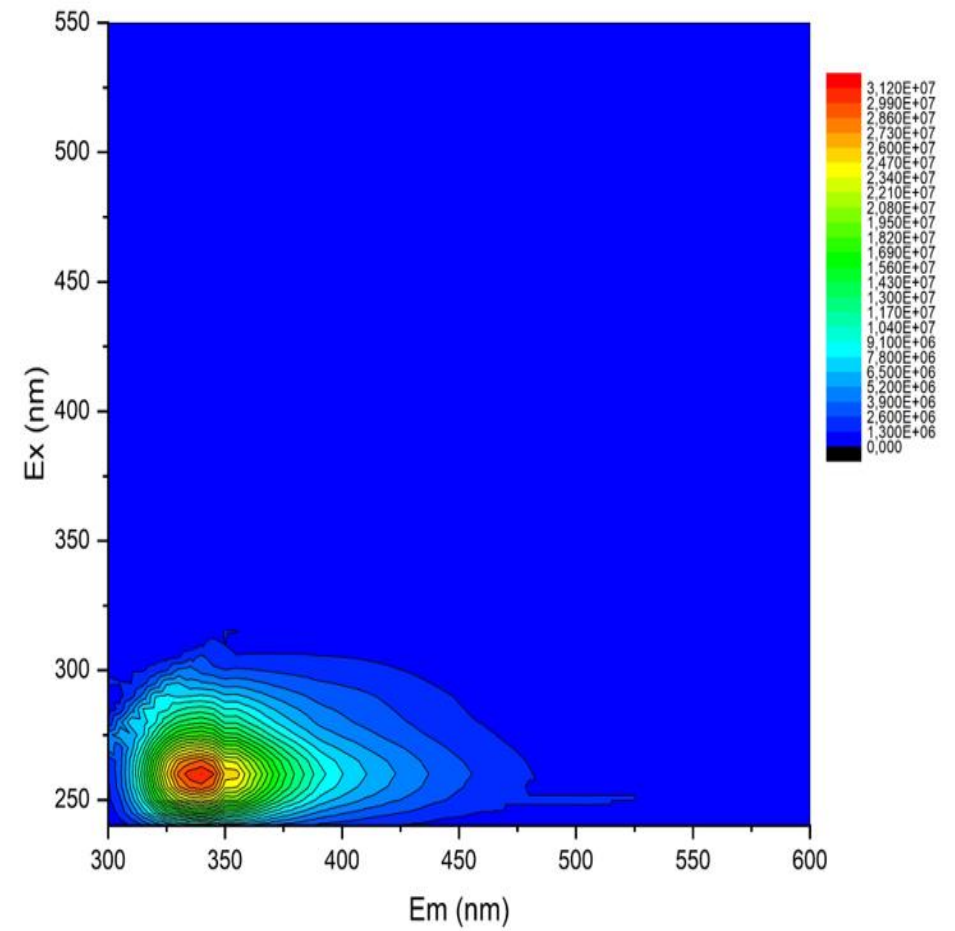
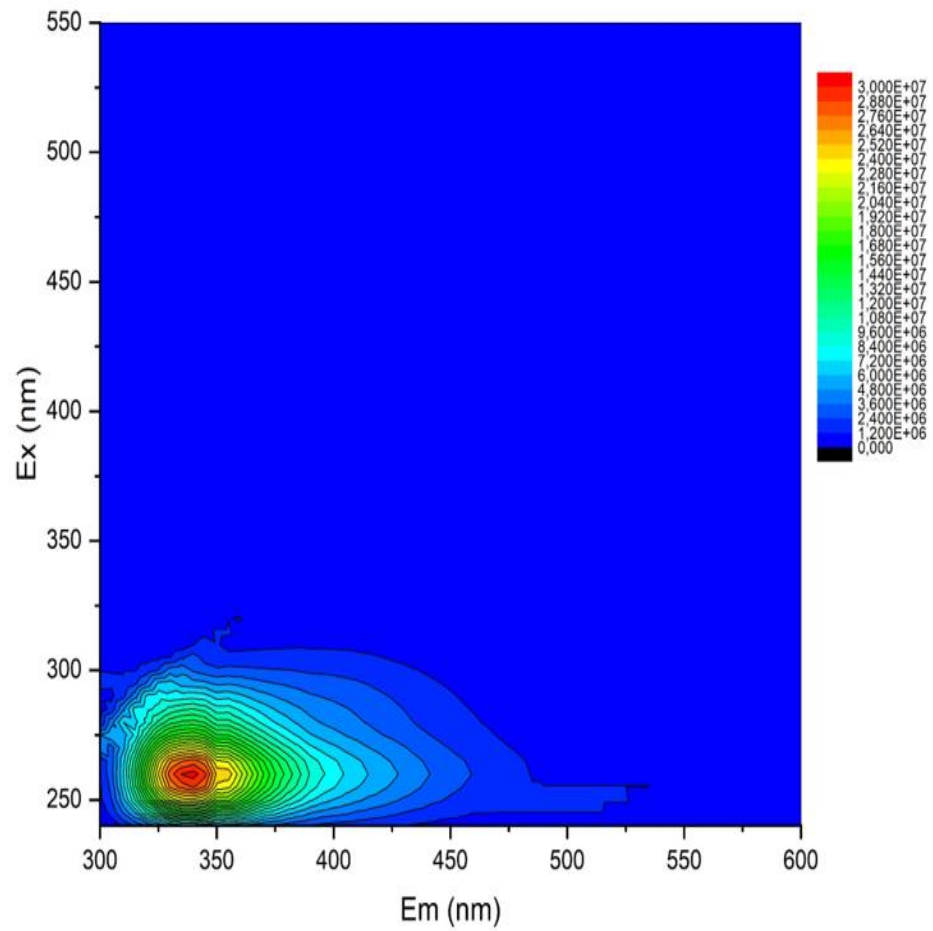
Mechanizmus vzniku humínových kyselín a ich interakcií s inými zlúčeninami je stále neobjasnený a stále sa skúma. Jeden z problémov sú samotné humínové kyseliny a ich zložitá štruktúra. Pre zjednodušenie merania na túto problematiku sa používajú modelové zlúčeniny. Modelové zlúčeniny sú látky, ktoré obsahujú rovnaké funkčné skupiny ako humínové kyseliny a sú v podstate ich podštruktúrne jednotky. Pre túto prácu boli vybrané dve modelové zlúčeniny, ktoré sú na Obr. 14, kyselina gallová a pyrogallol.



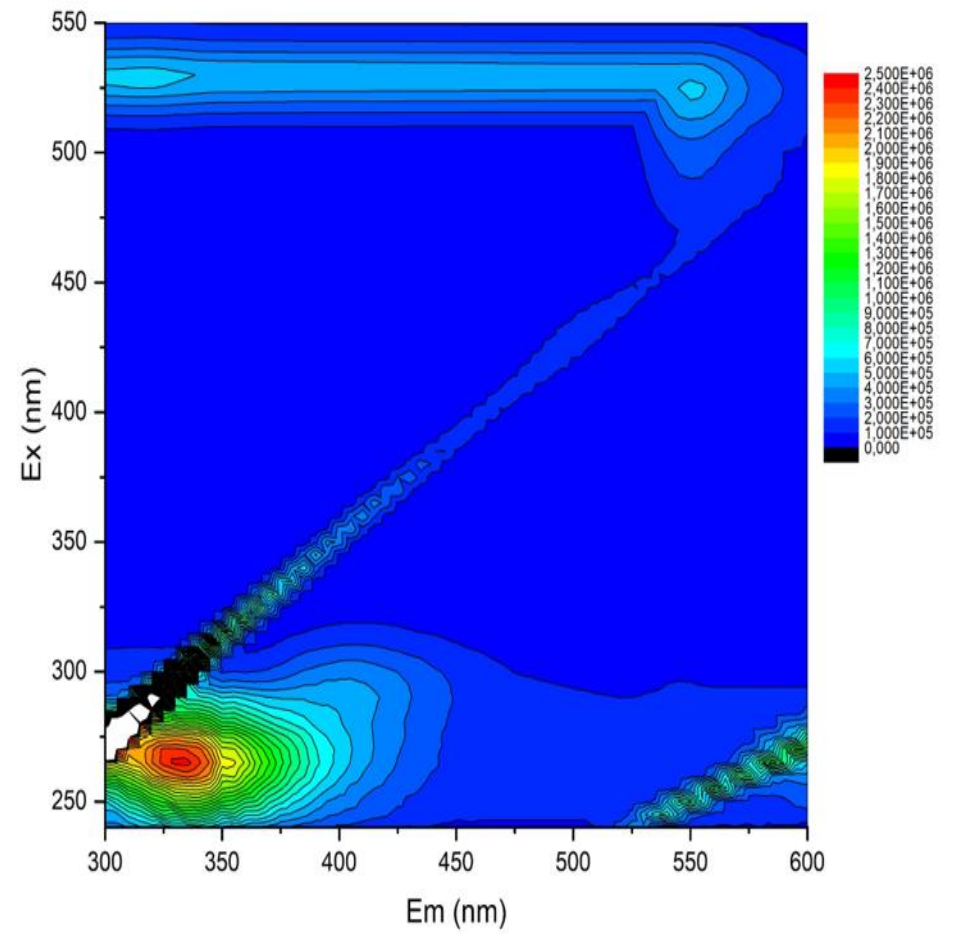
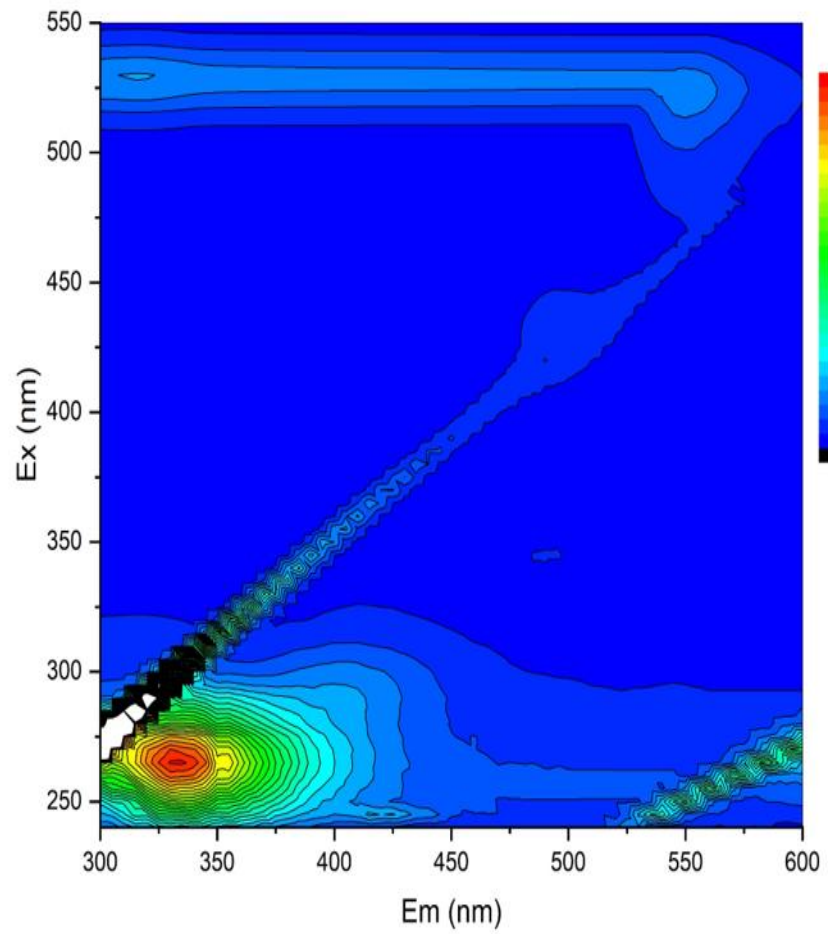
Obr. 14: Kyselina gallová (naľavo) a pyrogallol (napravo)

Pre meranie modelových zlúčenín boli vybrané koncentračné pomery model/Septonex: 1/1 a 1/2 (viz. *kapitola 5.5.1.2*) pre ich dobrú viditeľnosť medzimolekulovej interakcie, t.j. zhášanie a hypsochrómny posun v prípadoch komplexu HK-Septonex, respektíve mHK-Septonex. Ako môžeme vidieť na *Obr. 14*, tak kyselina gallová má v štruktúre karboxylovú skupinu, takže bude modelovou zlúčeninou zastupujúcou karboxylové skupiny v humínových kyselinách. Naopak pyrogallol obsahuje len hydroxylové skupiny, bude modelovou zlúčeninou pre fenolové skupiny v humínových kyselinách. Môžu nastať tri varianty. Prvý bude ten, že nastane zhášanie a modrý posun s kyselinou gallikovou a nie pyrogallolom. To by znamenalo, že hlavnou funkčnou skupinou v interakcii so Septonexom sú karboxylové skupiny. Druhý variant by bol opačný, zhášanie a modrý posun nastane s pyrogallolom. To by znamenalo, že hlavnú rolu v interakcii so Septonexom budú mať hydroxylové skupiny a ich konformácia na aromatických jadrách. Na *Obr. 15* a *Obr. 16* (taktiež *Príloha 19* a *Príloha 20*) je vidieť, že interakcia modelových zlúčenín so Septonexom sa prejavila malým zhášaním a žiadnym posunom.

To nás utvrdilo v našej hypotéze, že za interakciu so Septonexom sú zodpovedné aromatické jadrá v štruktúre humínových kyselín, respektíve v ich metylovaných štruktúrach. Gu a spol. [47] pri skúmaní interakcie HK s iónami chrómu taktiež došli k záveru, že ióny chrómu sa pútajú k aromatickým jadrám v štruktúrach humínových kyselín, a to interakciami ako vodíkové väzby, hydrofóbne a elektrostatické interakcie. Tieto interakcie by mohli spôsobovať modrý posun na EEM spektrách. V našom meraní modelových zlúčenín, v prípade kyseliny gallovej ani pyrogallolu, modrý posun nenastal. Dôvodom môže byť fakt, že tieto modelové zlúčeniny obsahujú len jedno aromatické jadro, na rozdiel od humínových kyselín, v ktorých sa vyskytujú viacjadrové aromatické systémy. Interakcia v komplexe HK-Septonex sa prejavila zhášaním aj modrým posunom, čo môže znamenať, že Septonex interaguje s organickými látkami s jedným aromatickým jadrom inak ako s látkami s viacjadrovou aromatickou štruktúrou. Preto by sa na meranie interakcie mohli používať modelové zlúčeniny, ktoré obsahujú viac aromatických jadier pre sledovanie závislosti aromaticity v štruktúrach humínových kyselín na ich interakciu s nabitými organickými xenobiotikmi.



Obr. 15: EEM spektrá kyseliny gallikovej (naľavo) a jej zmesi so Septonexom v koncentračnom pomere 1/1 (napravo)

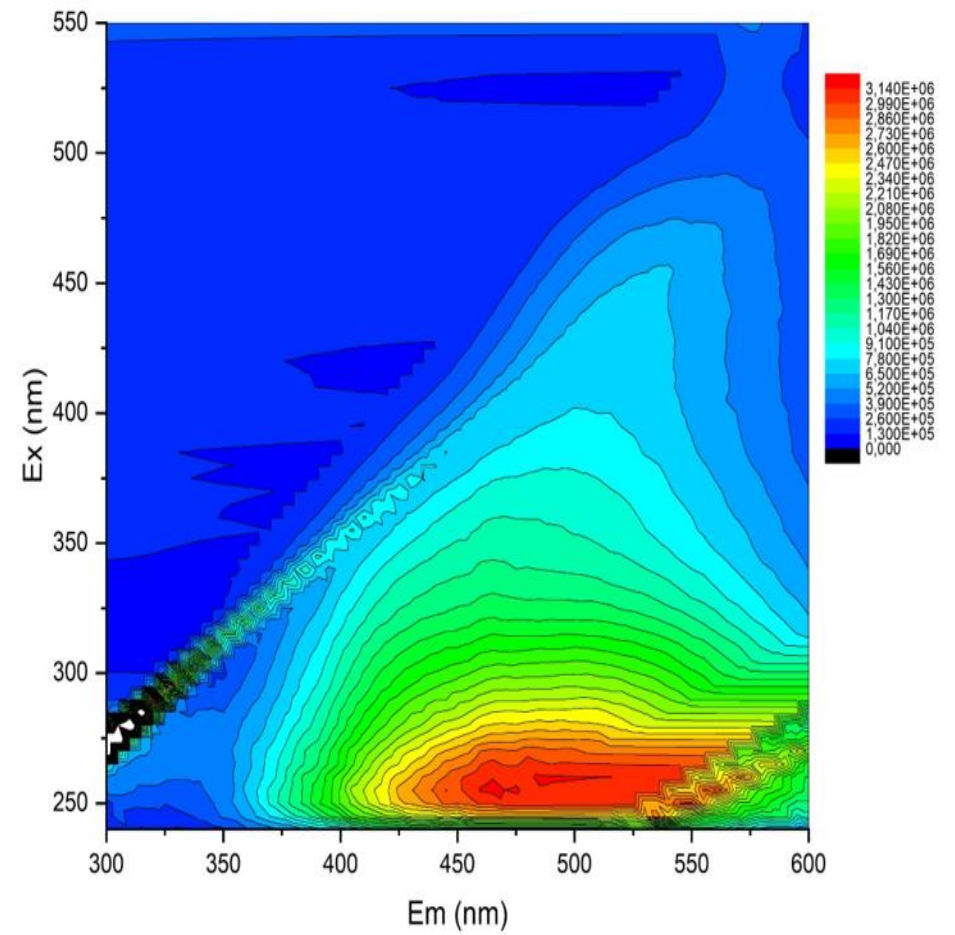
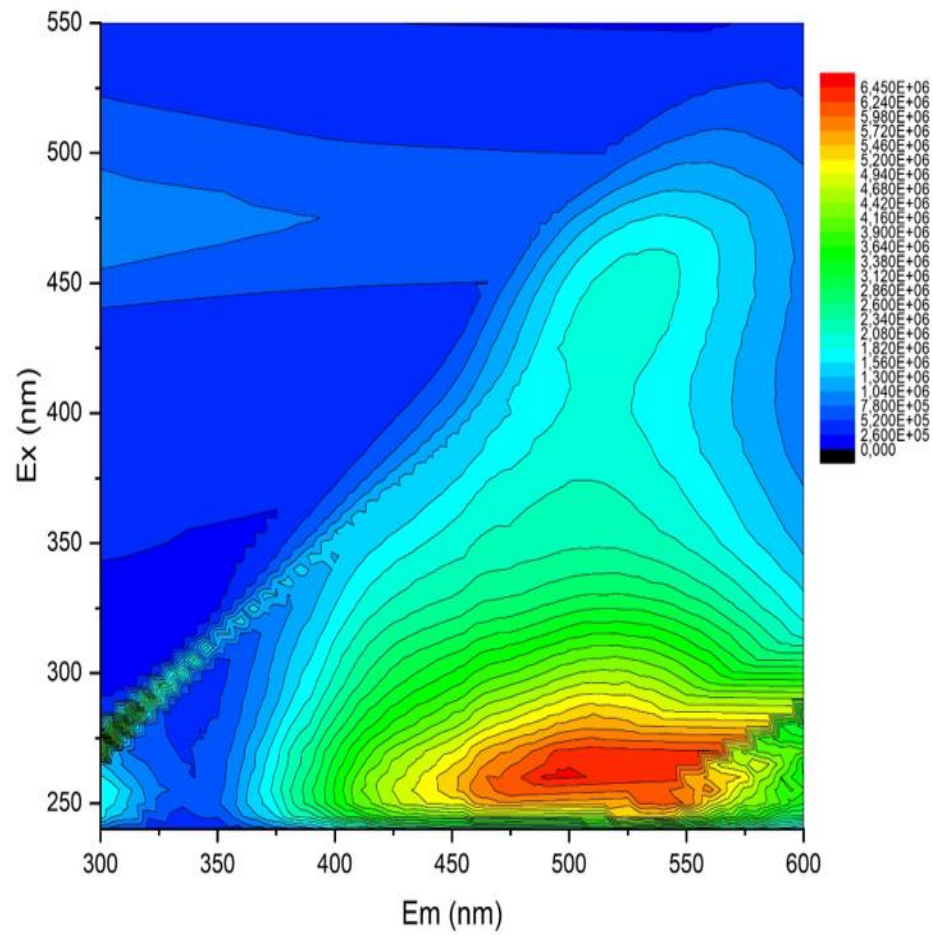


Obr. 16: EEM spektrá pyrogallolu (naľavo) a jeho zmesi so Septonexom v koncentračnom pomere 1/1 (napravo)

Ako môžeme vidieť na *Obr. 17* (spojenie *Obr. 8* a *Obr. 9*), metylácia sa na EEM spektrách prejavila hypsochromným posunom a zhasaním fluorescence. Rovnaký trend mala i interakcia so Septonexom. V prípade esterifikácie obsadzujeme karboxylové skupiny na estery. V prípade komplexu HK-Septonex sme očakávali väzbu na základe elektrostatickej interakcie, pretože Septonex má kladný náboj a HK majú záporný predovšetkým vďaka karboxylátovým (menej i fenolátovým) skupinám vo svojej štruktúre. Experimentálne štúdie realizované s modelovými benzenkarboxylátovými a benzenfenolickými zlúčeninami, ale i obdobné spektrálne stopy interakcie so Septonexom zistené pre pôvodné i metylované HK nás utvrdili, že na interakciu humínových kyselín se Septonexom má najväčší vplyv ich aromatická štruktúra, ktorá sa na študovanej fluorescence aktívne podieľala. Tým pádom by mala mať metylácia rovnaký vplyv na aromatickú štruktúru ako interakcia so Septonexom. Z modrého posunu fluorescenčnej emisie pozorovanej pre oba efekty je možné usudzovať, že ako metylácia, tak interakcia so Septonexom spôsobuje zníženie elektrónovej hustoty na aromatických štruktúrach HK.

Vplyv esterifikácie karboxylových skupín HK na hustotu elektrónov na susedných aromatických jadier je na prvý pohľad prekvapivý. Karboxylové skupiny ale budú v prípade meraných vzoriek (po rozpustení v NaOH bez spätného zníženia pH disociované do podoby karboxylátov ($-\text{COO}^-$)). Karboxylátové skupiny sa stávajú silnejším donorm elektrónov do susedného aromatického systému ako karboxylová skupina alebo jej esterová forma. V prípade metylovanej modifikácie humínových kyselín sa obsadzujú karboxylové skupiny a menia sa na estery, to znamená, že po rozpustení humínových kyselín v NaOH nenastáva premena karboxylových skupín na ich nabitú formu. Tým pádom znižujeme elektrónovú hustotu aromatických jadier v štruktúre humínových kyselín, čo môže mať za následok to, že sa emisné maximum posúva k nižším vlnovým dĺžkam (modrý posun).

V prípade HK-Septonex je charakterizovaná interakcia medzi aromatickou kostrou humínových kyselín so záporným parciálnym nábojom a bočným reťazcom Septonexu, ktorý má kladný náboj. Tým pádom môžeme predpokladať že nastáva π -katión interakcia. Septonex so svojím kladným nábojom dokáže polarizovať aromatický kruh humínových kyselín. Pri viacjadrovom aromatickom komplexe v humínových kyselín, kde každý aromatický kruh má nábojovú distribúciu, môžeme hovoriť o existencii kvadrupólu, respektíve v interakcii so Septonexom interakciu katión – kvadrupól. Tým pádom interakciou so Septonexom zmeňujeme obsah voľných aromatických jadier, čo znamená že znižujeme elektrónovú hustotu celkovej aromatickej kostry humínových kyselinách, čo sa nám mohlo prejavíť na EEM spektrách hypsochromným (modrým) posunom.



Obr. 17: EEM spektra HK (naľavo) a mHK (napravo)

7 ZÁVER

Táto diplomová práca bola zameraná na štúdium interakcie humínových skupín s iónovými organickými xenobiotikmi a jej štruktúrne aspekty. Metóda bola zvolená z mojej bakalárskej práce, a to ustálená fluorescenčná spektroskopia, ktorá je vhodná i pre látky so slabou svietivosťou. Cieľom práce bolo na základe realizovaných experimentov zhodnotiť výhody a limity použitej metodiky a diskutovať nové poznatky o štruktúrnych aspektoch interakcií medzi HL a organickými iónmi.

Interakcia medzi humínovými kyselinami a zástupcom iónových organických xenobiotik (Septonex) sa prejavila zhášaním fluorescencie humínových kyselín a posunom emisného maxima k nižším vlnovým dĺžkam, t.j. hypsochromným (modrým) posunom. Čím bola väčšia koncentrácia xenobiotika, tým bolo zhášanie fluorescencie i modrý posun väčší. Na základe zrealizovaných experimentov, kde sme okrem humínových kyselín a Septonexu použili metylovanú modifikáciu HK a modelové zlúčeniny, sme si potvrdili hypotézu, že za interakciu v štruktúre humínových kyselín nie sú zodpovedné karboxylové alebo fenolové skupiny, ale aromatická kostra humínových kyselín. Z výsledkov meraní môžeme predpokladať, že interakcia, ktorá sa vytvára medzi aromatickými štruktúrami v humínových kyselinách a Septonexom, môže byť π -katión interakcia. Bočný reťazec Septonexu, ktorý má kladný náboj, vytvára medzimolekulárnu interakciu s aromatickou kostrou humínových kyselín, ktoré majú parciálny záporný náboj.

Rovnaký trend interakcie, zhášanie fluorescencie a modrý posun, má modifikácia humínových kyselín na ich metylovanú verziu. Tento fakt nás utvrdzuje vo vyššie spomenutej hypotéze o π -katión interakcii, zároveň aj môže vysvetliť, prečo sa interakcia prejavuje modrým posunom. V oboch prípadoch nastáva zmena indukčného efektu aromatickej kostry humínových kyselín, presnejšie k zmenšeniu elektrónovej hustoty aromatických jadier. V prípade interakcie so Septonexom sa obsadzujú aromatické jadrá, znižujú plochu aromatickej kostry s voľnými π elektrónami a tým znižujú elektrónovú hustotu celej aromatickej kostry HK. V druhom prípade metylovanou modifikáciou znižujeme obsah karboxylátových skupín ($-\text{COO}^-$) po rozpustení humínových kyselín v NaOH. Karboxylátové skupiny majú vysoký kladný indukčný efekt, to znamená, že vysoko zväčšujú elektrónovú hustotu aromatických štruktúr v humínových kyselinách. Preto nastáva v metylovaných humínových kyselinách zníženie indukčného efektu a zmenšenie elektrónovej hustoty oproti nemodifikovaným humínovým kyselinám. Dospelo sa k záveru, že elektrónová hustota aromatickej kostry môže ovplyvňovať celkový obraz humínových kyselín, aj ich interakcie.

Nasledujúce experimenty by sa mohli zamerať na samotné štúdium vplyvu elektrónovej hustoty na interakcie humínových kyselín s ostatnými látkami, buď pomocou štúdia interakcie modelových zlúčenín, ktoré budú obsahovať viac aromatických jadier a bude sa dať sledovať elektrónová hustota väčšej aromatickej kostry, alebo sa zamerať na štúdium závislosti funkčných skupín s vysokým indukčným efektom na medzimolekulovú interakciu s iónovými zlúčeninami.

8 ZDROJE

- [1] SENN, T. L. a A. R. KINGMAN. *A review of humus and humic acids* [online]. 1973, Research Series No. 145, S. C. Agricultural Experiment Station, Clemson, South Carolina, [cit. 2016-12-27]. Dostupné z: <<http://andersonshumates.com/certificationsand-research/>>.
- [2] TAN, K. H. *Humic matter in soil and the environment: principles and controversies*. New York: Marcel Dekker, c2003. Books in soils, plants and the environment. ISBN 0-8247-4272-9.
- [3] STEINBERG, Ch. *Ecology of humic substances in freshwaters: determinants from geochemistry to ecological niches*. New York: Springer, 2003. ISBN 3-540-43922-6.
- [4] Chen, J.; Gu, B.; LeBoeuf, E.J.; Pan, H.; Dai, S.: Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, 2002, vol. 48, s. 59–68.
- [5] O huminových látkách. IHSS Česká republika [online]. Brno, [2008] [cit. 2020-01-17]. Dostupné z: <http://ihss-cz.cz/o-huminovych-latkach.html>
- [6] Senesi, N.; Miano, T. M.; Provenzano, M.R.; Brunetti, G.: Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*, 1991, vol. 152, s. 259–271.
- [7] Skybová, M.: Humínové kyseliny – přínos pre environmentálny výskum, *Acta Montanistica Slovaca*, 2006
- [8] Zaccone, C.; Cocozza, C.; D’Orazio, V.; Plaza, C.; Cheburkin, A.; Milano, T.M.: Influence of extractant on quality and trace elements content of peat humic acids. *Chemosphere*, 2007, vol. 73, s. 820–830.
- [9] Davies, G.; Ghabbour, E.A.; Steelink, C.: Humic acids: Marvelous products of soil chemistry. *Journal of Chemical Education*, 2001, vol. 78, no.12, s. 1609–1614.
- [10] Novák, J.; Kozler, J.; Janoš, P.; Šeříková, J.; Tokarová, V.; Madronová, L.: Humic acids from coals of the North-Bohemian coal field I. Preparation and characterisation. *Reactive & Functional polymers*, 2001, vol. 47, s. 101–109.
- [11] Campitelli, P.A.; Velasco, M.I.; Ceppi, S.B.: Chemical and physicochemical characteristics of humic acids extracted from compost, soil and amended soil. *Talanta*, 2006, vol. 69, s. 1234–1239.
- [12] Sen, D.; Jin-jing, Z.: Humic Effect of organic materials application on structural characteristic of soil humic acids, In *Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society. Karlsruhe, 30 July-4 August, 2006*. Ed. Fritz H. Frimmel, Gurdun Abbt-Braun. Karlsruhe: Universität Karlsruhe, 2006, s. 549–552. ISSN 1612-118x.
- [13] Výzkumná zpráva mezi konsorciem HUMING a Doly Bíliny, Huming Praha, 1991
- [14] Mikulášková, B.; Lapčík, L.; Mašek, I.: Lignit – Struktura, vlastnosti a použití. *Chemické Listy*, 1997, vol. 91, s. 160–168.
- [15] Veselá, L.; Kubal, M.; Kolzer, J.; Innemanová, P.: Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*, 2005, vol. 99, s. 711–717.

- [16] STEVENSON, F. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, c1994. ISBN 04-715-9474-1.
- [17] Piccolo, A.: The Supramolecular Structure of Humic Substances: A Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science. 2002, [cit. 2008-02-10]. Dostupné z: <http://www.suprahumic.unina.it/pages/2002pag.html>
- [18] Novotná, I.: *Sledování vlastností huminových kyselin metodou synchronní fluorescenční spektroskopie*. Diplomová práce FCH VUT Brno, 2006.
- [19] Bittner, M.: *Ecotoxicological Aspects of Humic Substance*. Ph.D. thesis, Faculty of Science MU Brno, 2007.
- [20] Conte, P.; Spaccini, R.; Šmejkalová, D.; Nebbioso, A.; Piccolo, A.: Spectroscopic and conformational properties of size-fractions separated from a lignite humic acid. *Chemosphere*, 2007, vol. 69, s. 1032–1039.
- [21] Chen, Ch.; Wang, X.; Jiang, H.; Hu, W.: Direct observation of macromolecular structures of humic acid by AFM and SEM. *Colloids and surfaces*, 2007, vol. 302, s. 121–125.
- [22] ANDELKOVIĆ, T., J. PEROVIĆ, M. PURENOVIĆ, S. BLAGOJEVIĆ, R. NIKOLIĆ, D. ANDJELKOVIĆ a A. BOJIĆ. Spectroscopic and potentiometric studies on derivatized natural humic acid. *Analytical Science*. 2006, r. 22, č. 12, s. 1553–1558. ISSN 0910-6340.
- [23] ANDELKOVIĆ, T., J. PEROVIĆ, M. PURENOVIĆ, S. BLAGOJEVIĆ, R. NIKOLIĆ, D. ANDJELKOVIĆ a A. BOJIĆ. A direct potentiometric titration study of the dissociation of humic acid with selectively blocked functional groups. *Eclética Química*. 2006, r. 31, č. 3, s. 39–46. ISSN 0100-4670.
- [24] VAN'T ERVE, T. J., R. H. RAUTIAINEN, L. W. ROBERTSON a G. LUTHE. Trimethylsilyldiazomethan: A safe non-explosive, cost effective and less-toxic reagent for phenol derivatization in GC applications. *Environment International*. 2010, r. 36, č. 8, s. 835–842. ISSN 0160-4120.
- [25] KLUČÁKOVÁ, M., M. KALINA, P. SEDLÁČEK a L. GRASSET. Reactivity and transport mapping of Cu(II) ions in humic hydrogels. *Journal of Soils and Sediments*. 2014, r. 14, č. 2, s. 368–376. ISSN 1439-0108.
- [26] STEINBÜCHEL, A. a R. H. MARCHESSAULT. *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 3-527-31154-8.
- [27] VAN RENSBURG, C. E. J. The antiinflammatory properties of humic substances: Amini review. *Phytotherapy Research*. 2015, r. 29, č. 6, s. 791–795. ISSN 0951418x.
- [28] Kučera, R.: *Flora Bohemia, Vliv a aplikace Lignohumátu*, [cit. 2007-12-20] Dostupné z: <http://www.floraboheemia.cz/clanky/co-je-to-lignohumat.html>
- [29] Vrba, V.; Huleš, L.: Humus - půda - rostlina (3) Humus a rostlina: Rozpustné humusové látky v ekosystému. *Biom.cz* [online]. 2006-11-23 [cit. 2008-02-21]. ISSN: 1801–2655 Dostupné z: <http://biom.cz/index.shtml?x=1939110>
- [30] Fišar, Z.: *Fluorescenční spektroskopie* [online]. 2004, poslední revize 4. 3. 2004, [cit. 2008-03-25]. Dostupné z: <http://www1.lfl.cuni.cz/%7Ezfišar/fluorescence/Default.htm>
- [31] The Molecular Probes® Handbook: Fluorescence Fundamentals [online]. Invitrogen. [cit. 2014-1-4]. Dostupné na URL: <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/introduction-to-fluorescence-techniques.htm>

- [32] Klán, P.: Organická fotochemie, 1. vyd., Vydavatelství MU Brno, 2001, 121 s, ISBN 80-210-2526-3.
- [33] LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springel, 2006. ISBN 978-0387-31278-1.
- [34] NAKASHIMA, K., M. MAKI, F. ISHIKAWA, T. YOSHIKAWA, Y. K. GONG a T.MIYAJIMA. Fluorescence studies on binding of pyrene and its derivatives to humic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2007, r.67, č. 3–4, s. 930–935. ISSN 1386-1425
- [35] Mobed, J.J.; Hemmingsen, S.L.; Autry, J.L.; McGown, L.B.: Fluorescence characterization of IHSS humic substances: Total luminescence spectra with absorbance correction. *Environmental Science & Technology*, 1996, vol. 30, s. 3061–3065.
- [36] Antunes, M.C.G.; Esteves da Silva, J.C.G.: Multivariable curve resolution analysis excitation-emission matrices of fluorescence of humic substances. *Analytica Chimica Acta*, 2005, vol. 546, s. 52–59.
- [37] Persson, T.; Wedborg, M.: Multivariate evaluation of the fluorescence of aquatic organic matter. *Analytica Chimica Acta*, 2001, vol.434, s. 179–192.
- [38] Yan, J.; Li, H.; Myrick, M.L.: Fluorescence fingerprint of waters: Excitation-emission matrix spectroscopy as a tracking tool. *Applied Spectroscopy*, 2000, vol. 54, no. 10, s. 1539–1542.
- [39] Muroski, A.R.; Booksh, K.S.; Myrick, M.L.: Single-measurement excitation/emission matrix spectrofluorometer for determination of hydrocarbons in ocean water. 1. instrumentation and background correction. *Analytical Chemistry*, 1996, vol. 68, no. 20, s. 3534–3538.
- [40] PERERA, Jilka M. a Geoffrey W. STEVENS. Spectroscopic studies of molecular interaction at the liquid–liquid interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, **395**(4), 1019-1032. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-009-2855-0
- [41] XIE, Lei, Nan XIAO, Lu LI, Xinan XIE a Yan LI. An Investigation of the Intermolecular Interactions and Recognition Properties of Molecular Imprinted Polymers for Deltamethrin through Computational Strategies. *Polymers*. 2019, 11(11). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym11111872
- [42] VERA, Andrés M. a Mariano CARRIÓN-VÁZQUEZ. Direct Identification of Protein-Protein Interactions by Single-Molecule Force Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*. 2016, **55**(45), 13970-13973. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201605284
- [43] LAMLEY, Jonathan M., Carl ÖSTER, Rebecca A. STEVENS a Józef R. LEWANDOWSKI. Intermolecular Interactions and Protein Dynamics by Solid-State NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015, **54**(51), 15374-15378. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201509168
- [44] SARIJLOO, Mohsen, Morteza JABBARI a Ali FARAJTABAR. Spectral Study of Intermolecular Interactions in Some Sulfolane/Alcoholic Binary Mixtures Using Solvatochromic Measurements. *Journal of Solution Chemistry*. 2019, **48**(6), 905-919. ISSN 0095-9782. Dostupné z: doi:10.1007/s10953-019-00889-9

- [45] DEMCHENKO, Alexander P. Practical aspects of wavelength ratiometry in the studies of intermolecular interactions. *Journal of Molecular Structure*. 2014, **1077**, 51-67. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2013.11.045
- [46] LEAVITT, Stephanie a Ernesto FREIRE. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current Opinion in Structural Biology*. 2001, **11**(5), 560-566. ISSN 0959440X. Dostupné z: doi:10.1016/S0959-440X(00)00248-7
- [47] GU, Yun-Lan, Ming-Xing YIN, Hong-Mei ZHANG, Yan-Qing WANG a Jing-hua SHI. Study on the binding interaction of chromium(VI) with humic acid using UV-vis, fluorescence spectroscopy and molecular modeling. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015, **136**, 1702-1709. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2014.10.069
- [48] BOGUTA, Patrycja, Zofia SOKOŁOWSKA a Leonardo FRACETO. Interactions of Zn(II) Ions with Humic Acids Isolated from Various Type of Soils. Effect of pH, Zn Concentrations and Humic Acids Chemical Properties. *PLOS ONE*. 2016, **11**(4). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0153626
- [49] MORDVINOVA, Ekaterina D., Marina V. PARKHATS, Yong CHEN, et al. Intermolecular interactions between natural humic substances and tricyclic antidepressants. *Mendeleev Communications*. 2019, **29**(4), 426-428. ISSN 09599436. Dostupné z: doi:10.1016/j.mencom.2019.07.024
- [50] XIE, Lei, Qiuyi LU, Xiaohui MAO, et al. Probing the intermolecular interaction mechanisms between humic acid and different substrates with implications for its adsorption and removal in water treatment. *Water Research*. 2020, **176**. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2020.115766
- [51] TCHAIKOVSKAYA, O. N., N. V. YUDINA, E. V. MALTSEVA, et al. Interaction of Humic Acids with Organic Toxicants. *Russian Physics Journal*. 2016, **59**(4), 597-603. ISSN 1064-8887. Dostupné z: doi:10.1007/s11182-016-0811-y
- [52] TARASENKO, Victor F., Andrey M. KABANOV, L. V. NECHAEV a O. N. TCHAIKOVSKAYA. The interaction between humic acid and naphthalene after exposure to visible and UV light. 2015-12-15, , 98100E-. Dostupné z: doi:10.1117/12.2225636
- [53] JING, Jianyuan, Shuiqin ZHANG, Liang YUAN, Yanting LI, Zhian LIN, Qizhong XIONG a Bingqiang ZHAO. Combining humic acid with phosphate fertilizer affects humic acid structure and its stimulating efficacy on the growth and nutrient uptake of maize seedlings. *Scientific Reports*. 2020, **10**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-74349-6

9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

HL – humínové látky

FK – fulvinové kyseliny

HK – humínové kyseliny

mHK – metylované humínové kyseliny

R.F.I – relatívna fluorescenčná intenzita

TMS-DM – (Diazometyl)trimetylsilán

TCSPC – *Time-correlated Single Photon Counting*

EEM – excitačno-emisné spektrá

ATR – *attenuated total internal reflection*

TIR – *total internal reflection*

CLM – *centrifugal liquid membrane*

VSF – *vibrational sum-frequency*

NMR – nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia

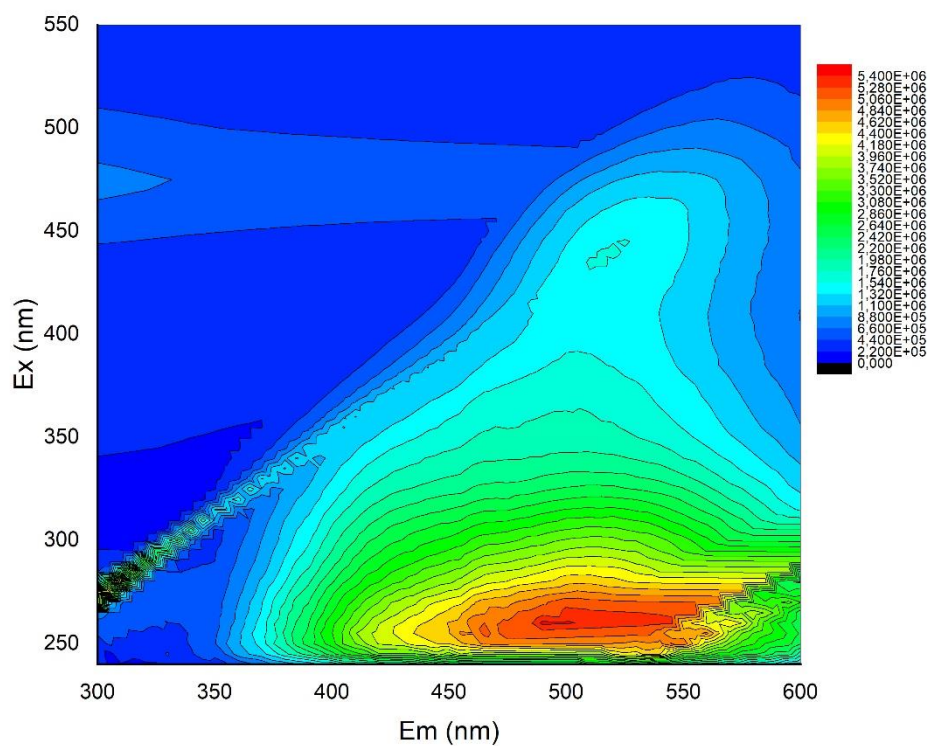
FTIR – Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou

AFM-SMFS – *Single-molecule force spectroscopy based on atomic force microscopy*

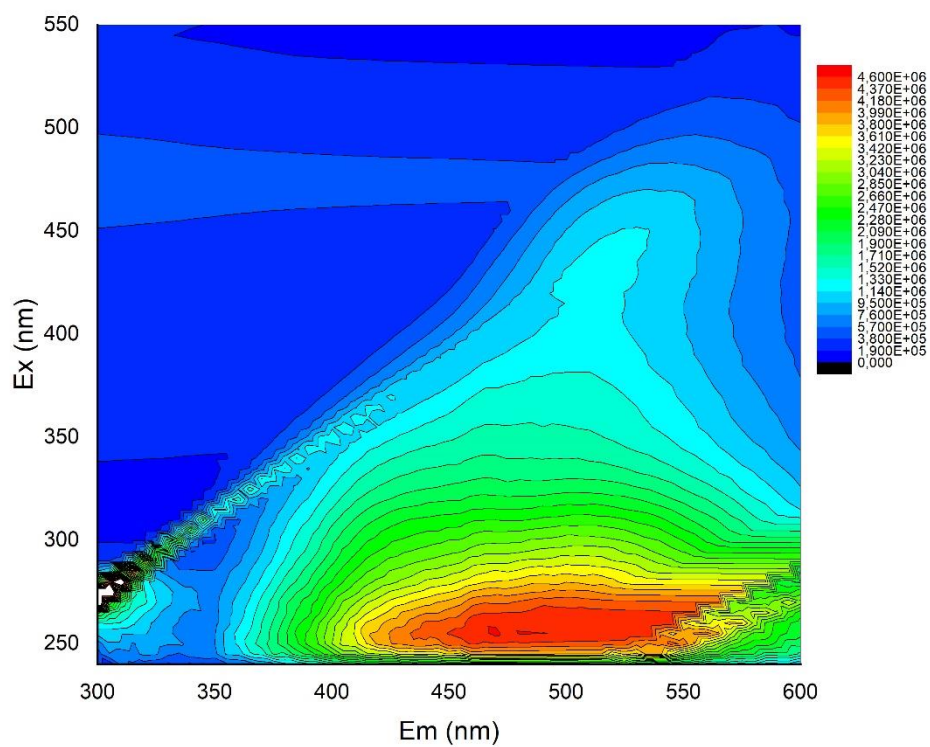
ITC – izotermálna titračná kalorimetria

Sep – Septonex

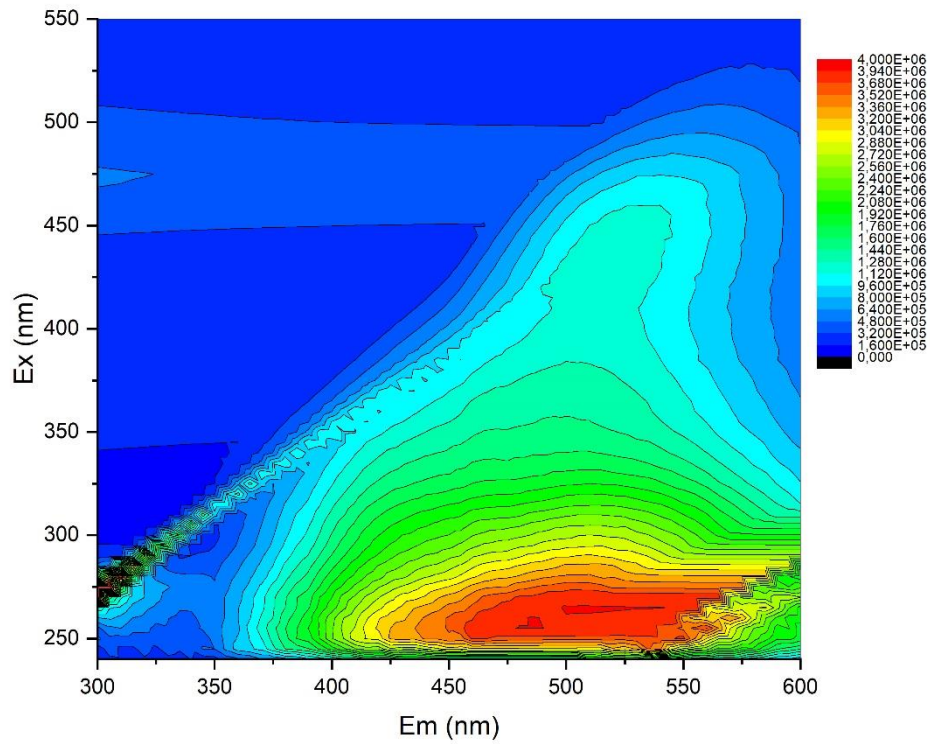
10 PRÍLOHY



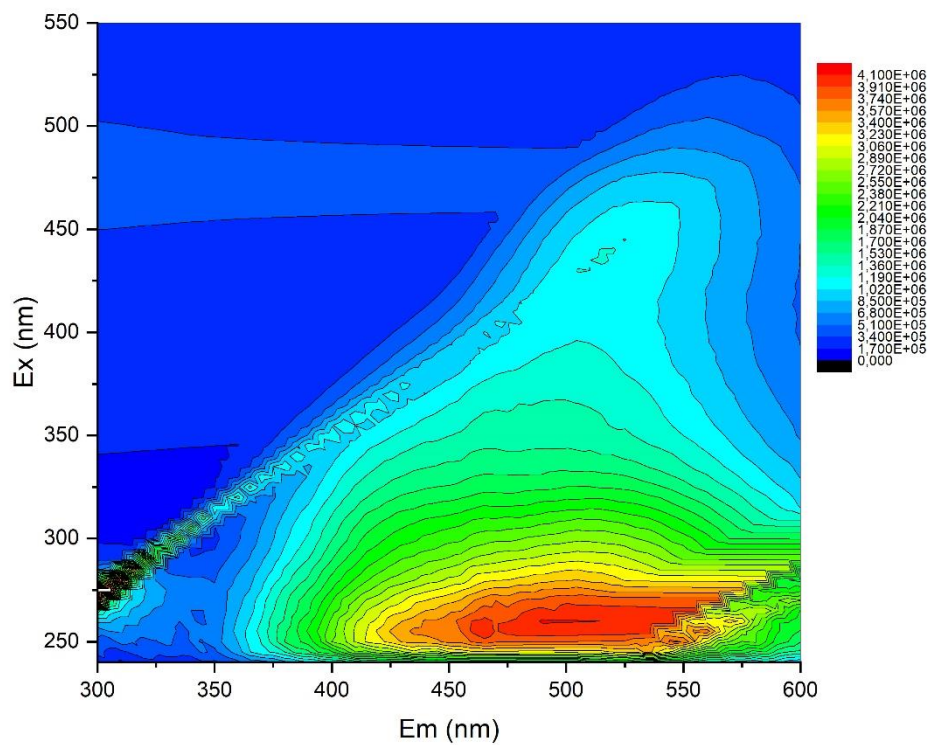
Príloha 1: EEM spektrá HK



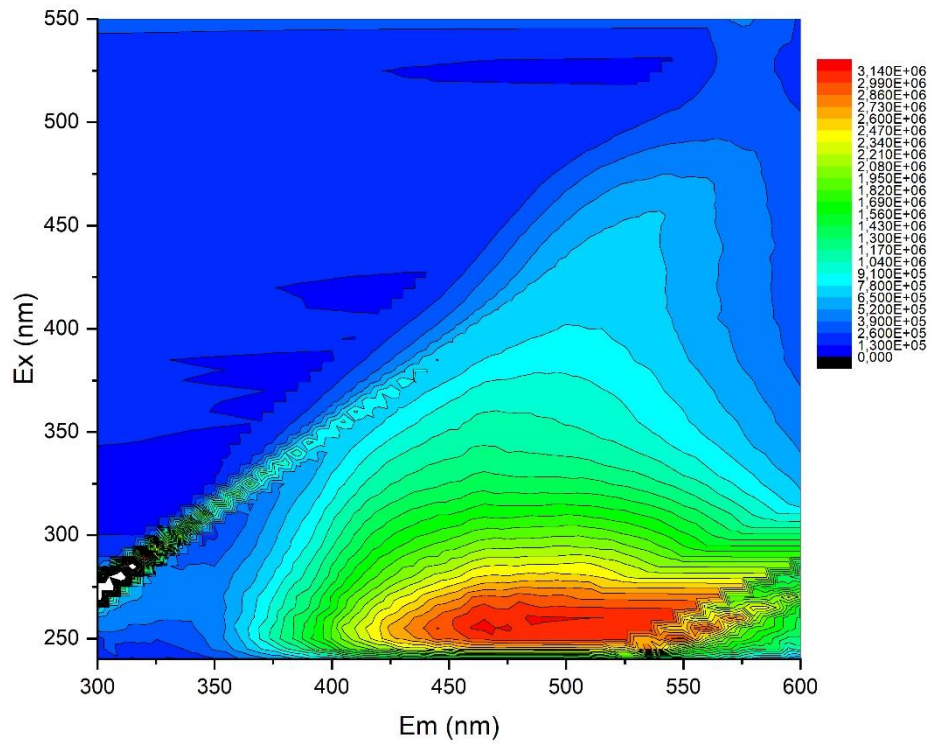
Príloha 2: EEM spektrá HK+Septonex v koncentračnom pomere 10/1



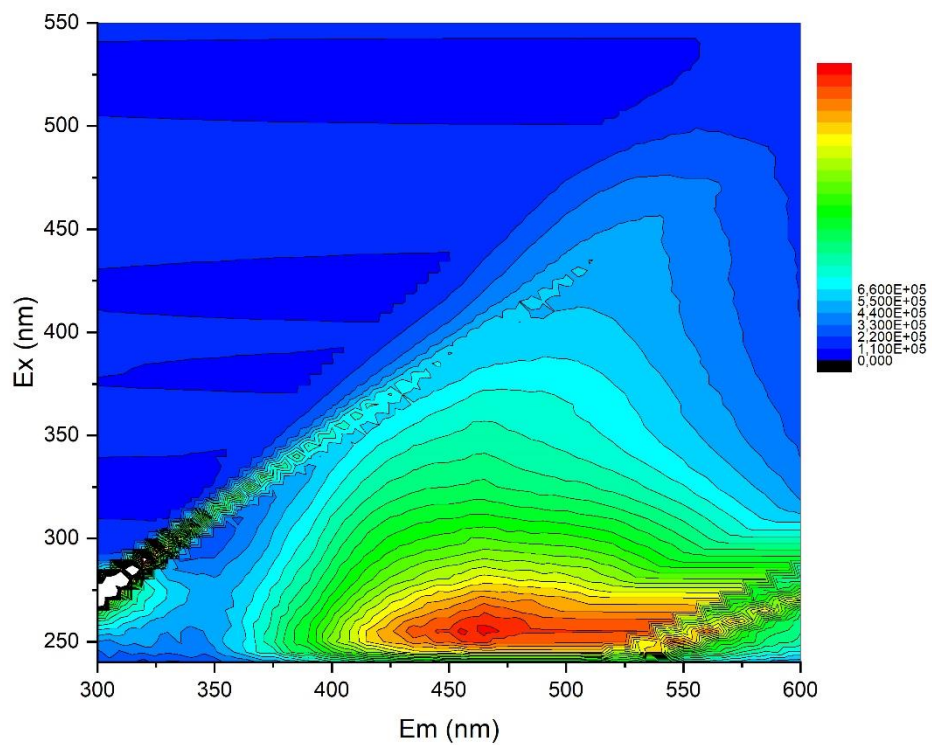
Príloha 3: EEM spektrá HK+Septonex v koncentračnom pomere 5/1



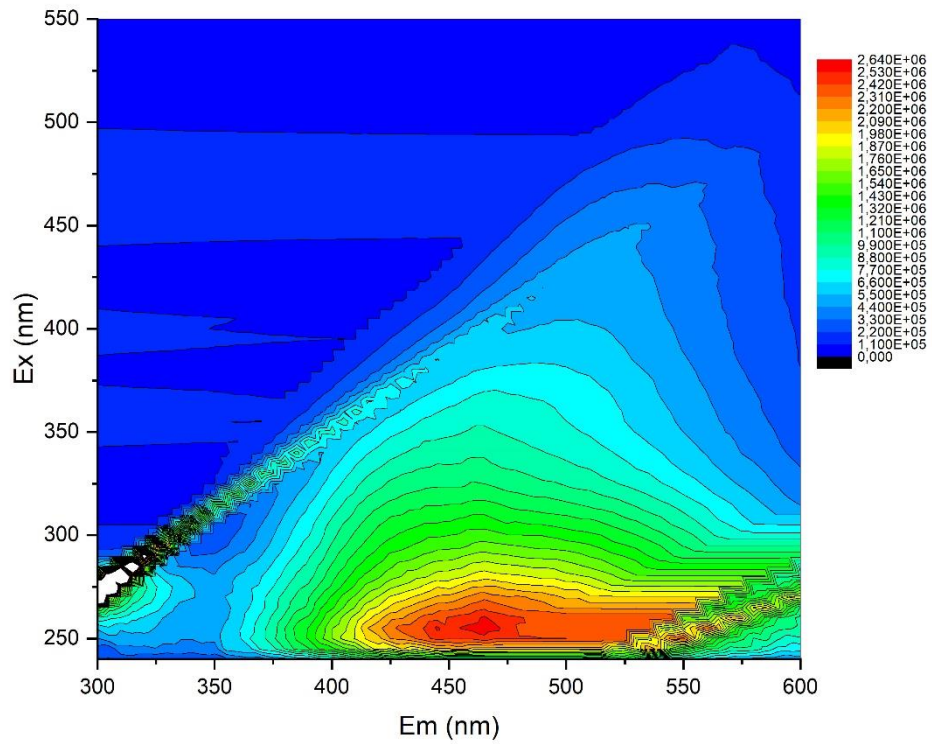
Príloha 4: EEM spektrá HK+Septonex v koncentračnom pomere 2/1



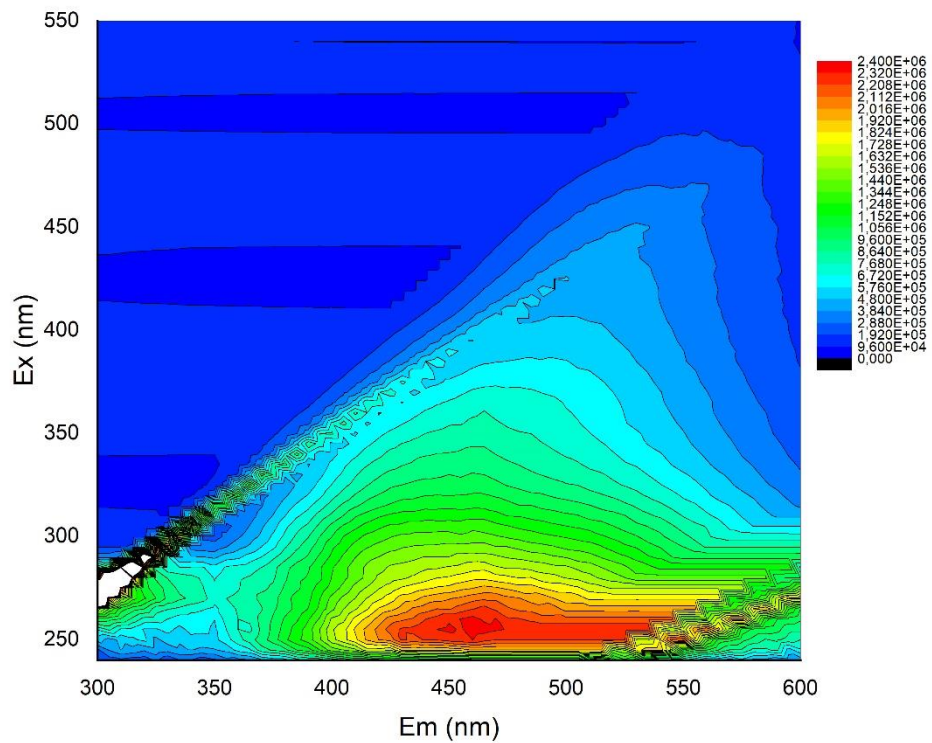
Príloha 5: EEM spektrá mHK



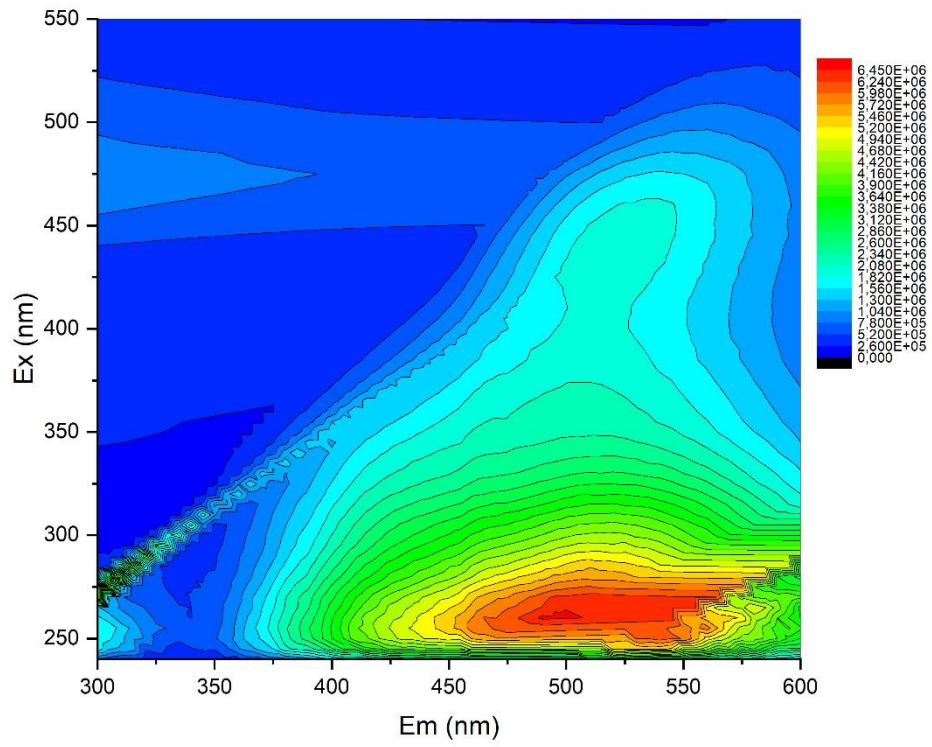
Príloha 6: EEM spektrá mHK+Septonex s koncentračným pomerom 10/1



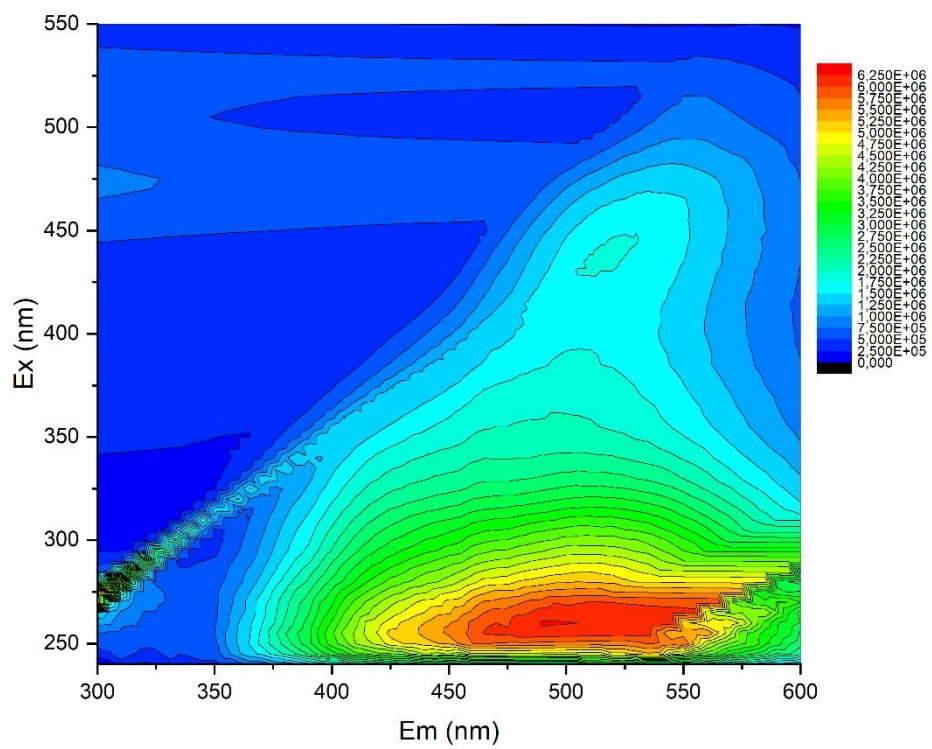
Príloha 7: EEM spektrá mHK+Septonex s koncentračným pomerom 5/1



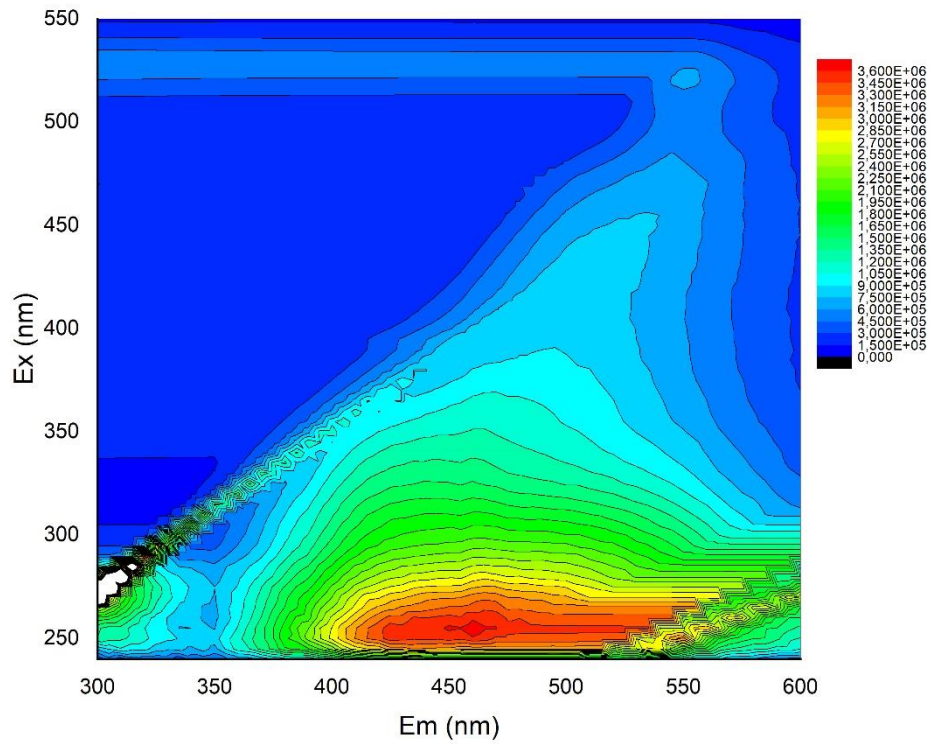
Príloha 8: EEM spektrá mHK+Septonex s koncentračným pomerom 2/1



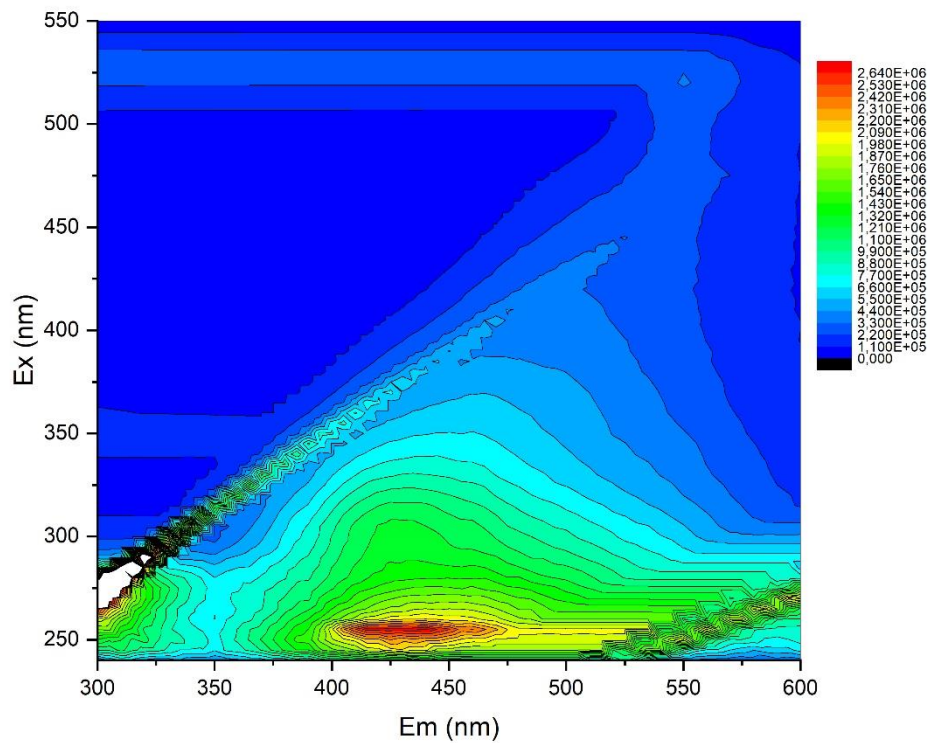
Príloha 9: EEM spektrá HK



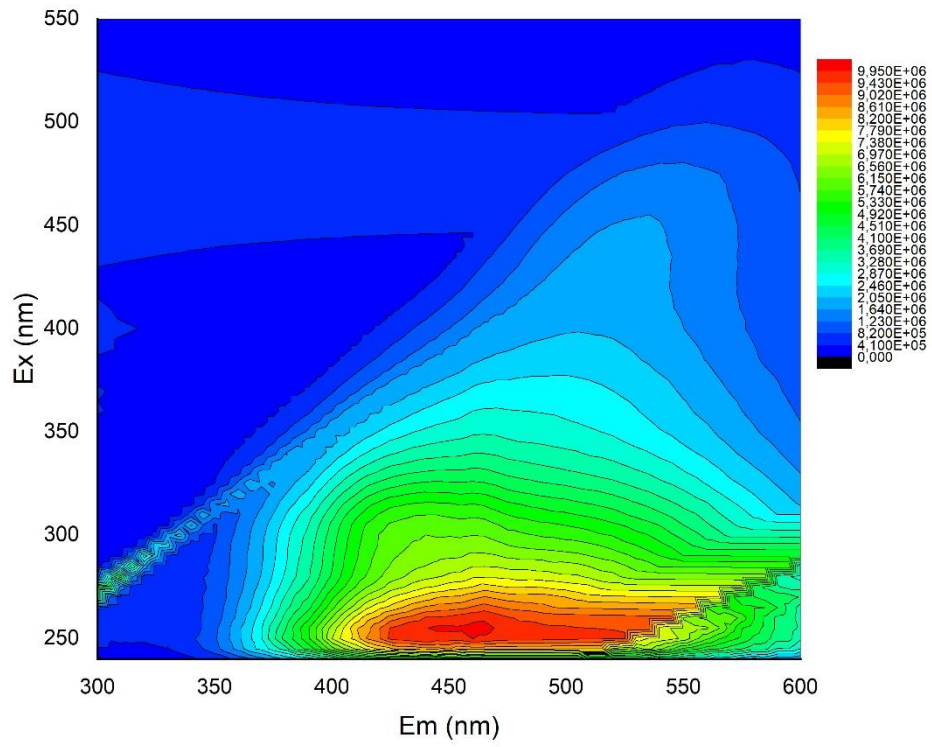
Príloha 10: EEM spektrá HK+Septonex s koncentračným pomerom 1/1



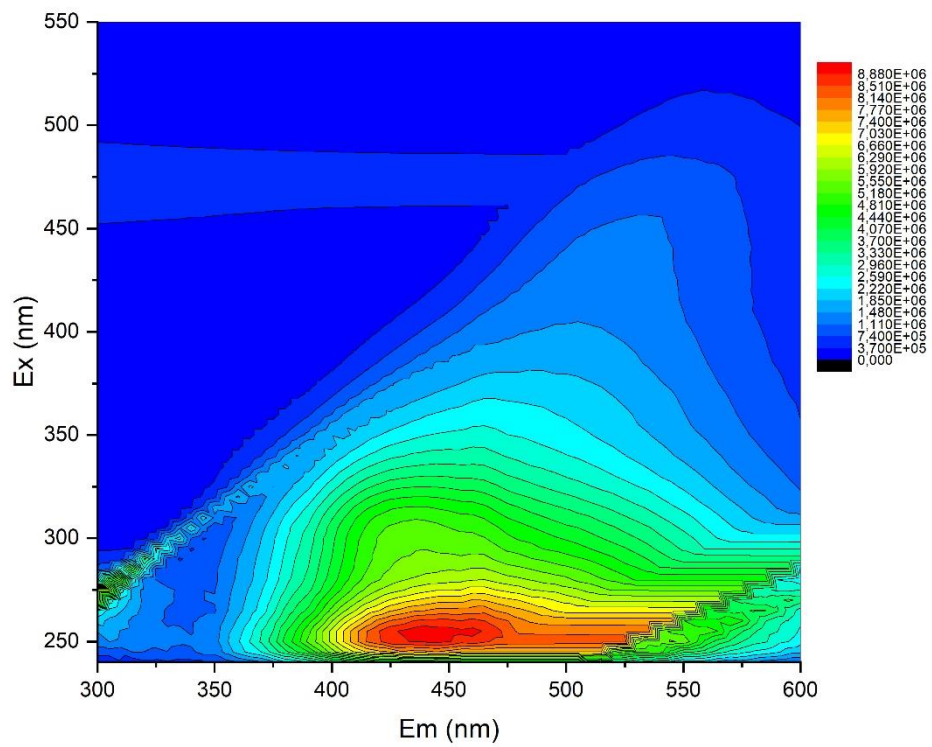
Príloha 11: EEM spektrá HK+Septonex s koncentračným pomerom 1/2



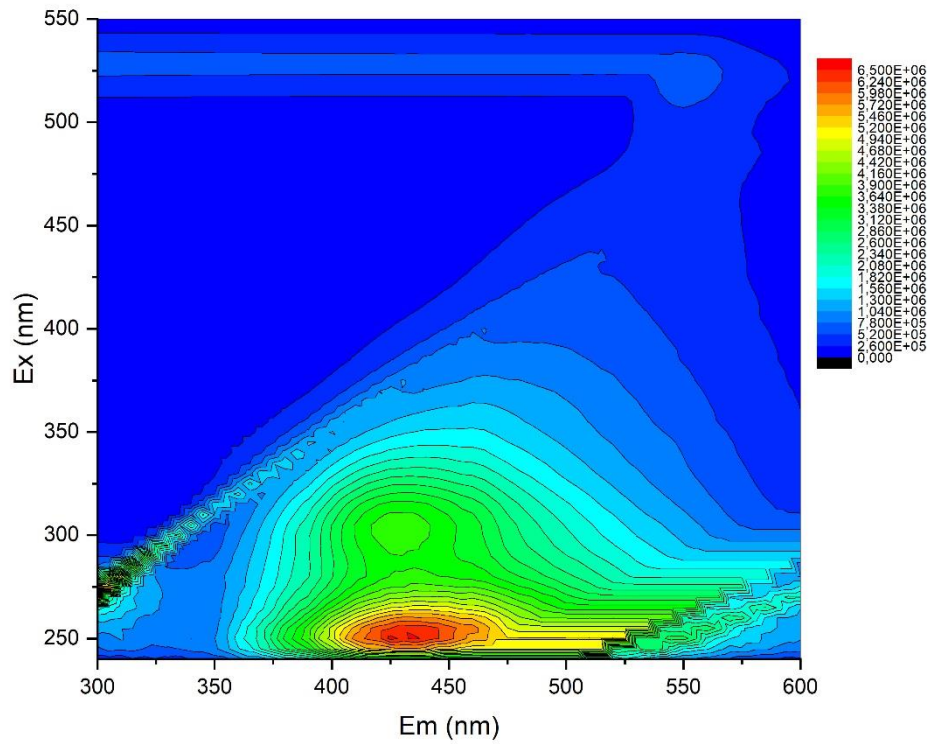
Príloha 12: EEM spektrá HK+Septonex s koncentračným pomerom 1/5



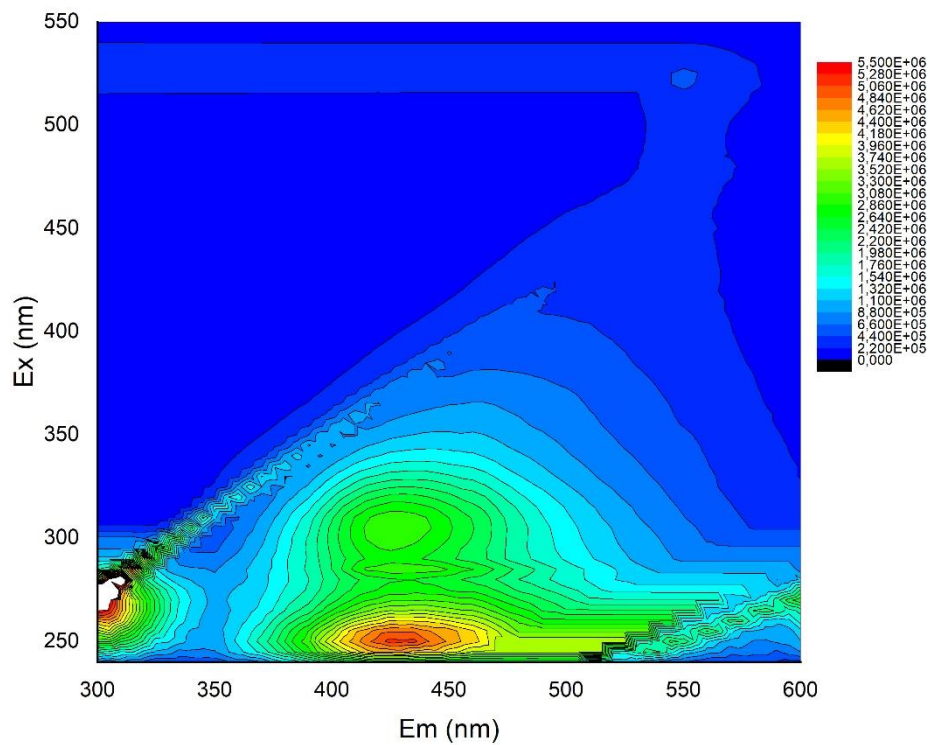
Príloha 13: EEM spektrá mHK



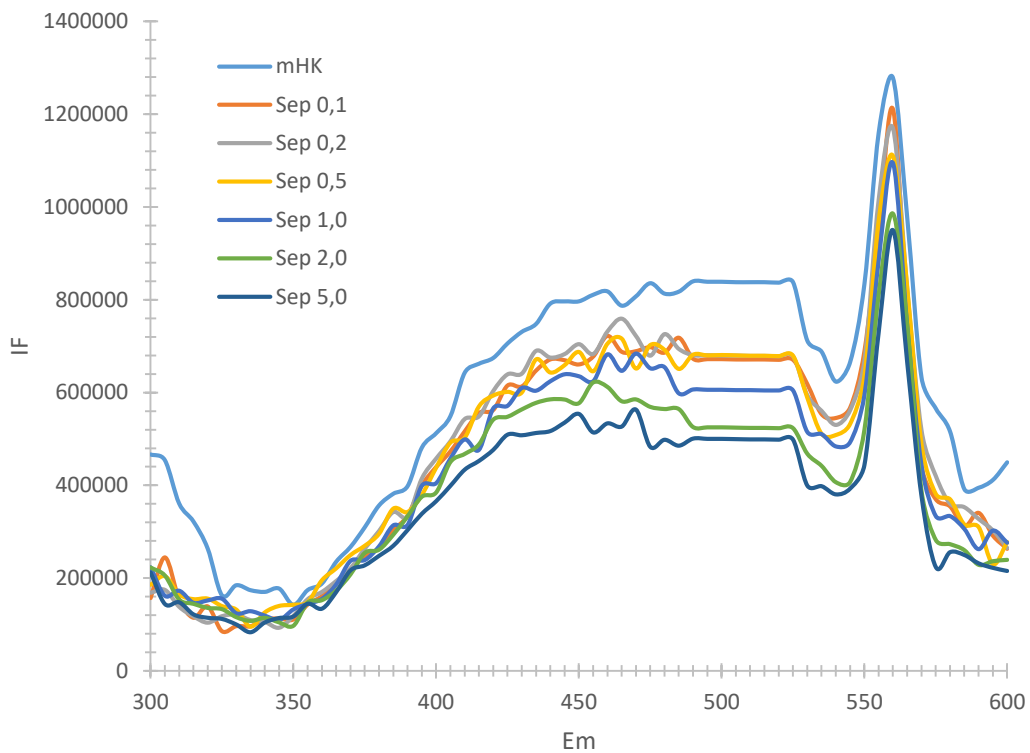
Príloha 14: EEM spektrá mHK+Septonex s koncentračným pomerom 1/1



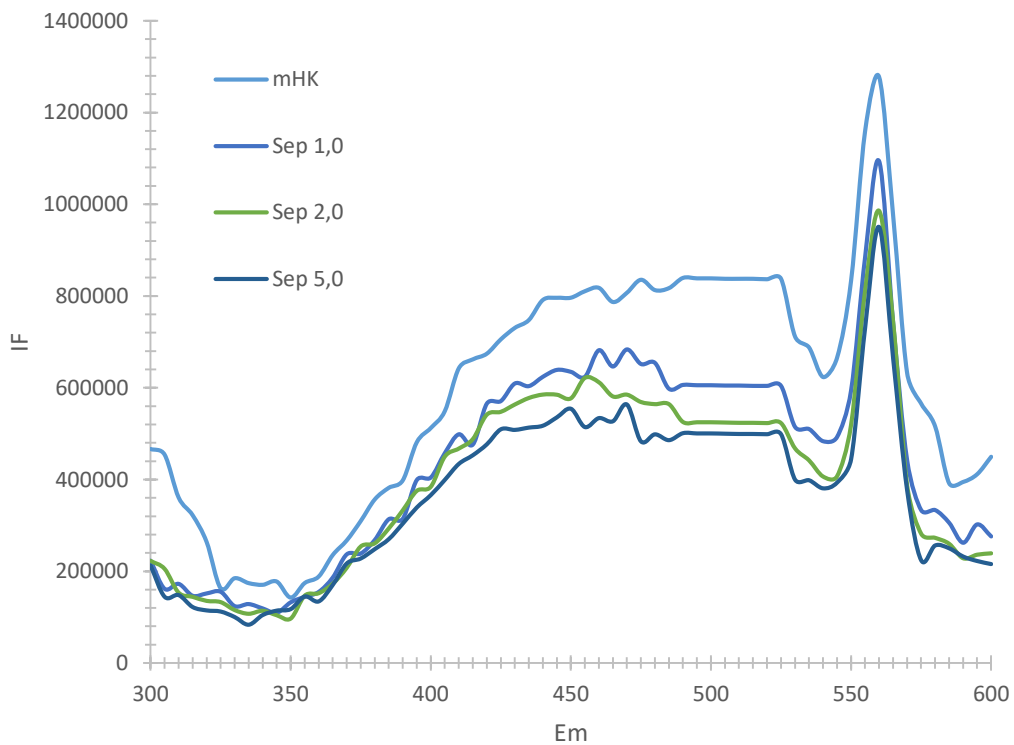
Príloha 15: EEM spektrá mHK+Septonex s koncetračným pomerom 1/2



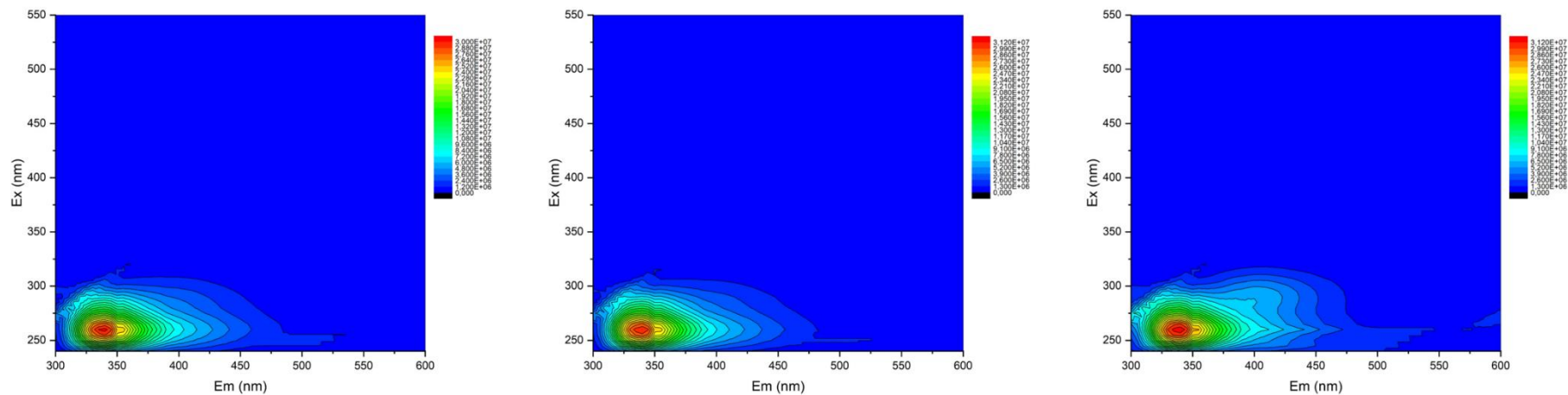
Príloha 16: EEM spektrá mHK+Septonex s koncetračným pomerom 1/5



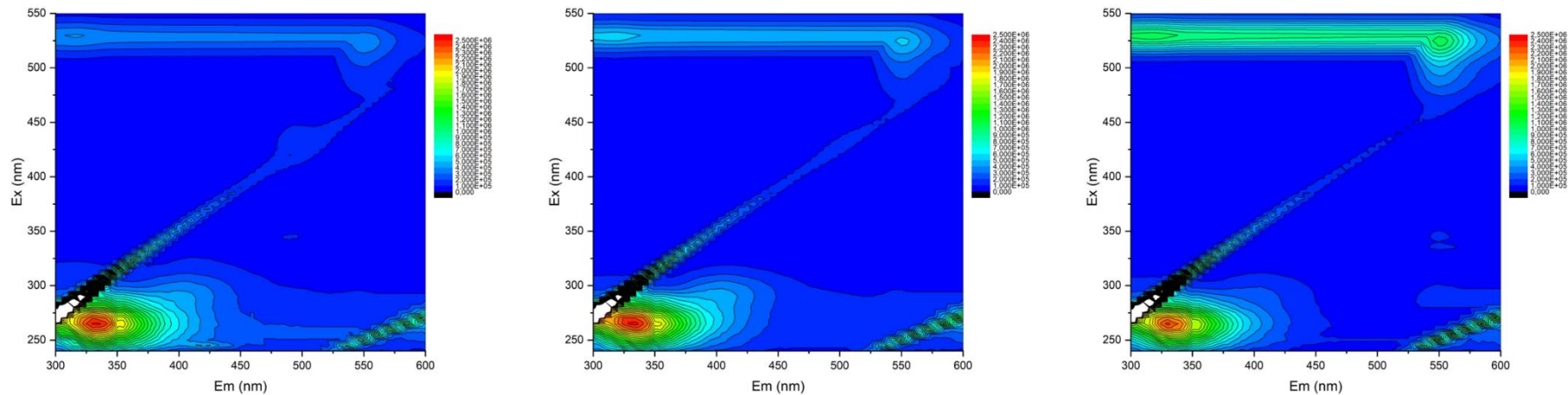
Príloha 17: Emisné spektrá mHK a mHK-Septonex zmesí s rôznymi koncentračnými pomermi mHK/Septonex



Príloha 18: Emisné spektrá mHK a mHK-Septonex zmesí s koncentračnými pomermi mHK/Septonex: 1/1, 1/2, 1/5



Príloha 19: EEM spektrá: kyselina galliková (naľavo), jej zmes so Septonexom v pomere 1/1 (v strede) a v pomere 1/2 (napravo)



Príloha 20: EEM spektrá: pyrogallol (naľavo), jeho zmes so Septonexom v pomere 1/1 (v strede) a v pomere 1/2 (napravo)